

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 15/53, 9/06, C12Q 1/32, 1/68, A61K 38/44 // (C12N 9/06, C12R 1:32)		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/32862 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Juli 1998 (30.07.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00484 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Januar 1998 (29.01.98) (30) Prioritätsdaten: 97101339.6 29. Januar 1997 (29.01.97) EP (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: AT usw. (71)(72) Anmelder und Erfinder: FLOHE, Leopold [DE/DE]; Im Vogelsang 5, D-38304 Wolfenbüttel (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SINGH, Mahavir [IN/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HUTTER, Bernd [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). KOLK, Arend [NL/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: L-ALANINE DEHYDROGENASE OF MYCOBACTERIUM MARINUM (54) Bezeichnung: L-ALANIN DEHYDROGENASE VON MYCOBACTERIUM MARINUM (57) Abstract <p>Tuberculosis is an infectious disease which kills more than 3 million people every year. Although both a vaccine and various methods of diagnosis and treatment are available the efficacy of these measures is in urgent need of improvement, given that the number of new cases is again on the rise. Research focuses, among other things, on the characterization of antigens secreted in the early stages of the infection as they constitute the first point of contact of the immune system with the pathogen. The 40 KD-antigen discussed in this article is present <i>in vivo</i> as a hexamer and, despite its high molecular weight and lack of a signal sequence, is present extracellularly after only a few days of growth. Functionally it is an L-alanine dehydrogenase and reacts with the monoclonal antibody HBT-10 directed against this protein. HBT-10 was the first known antibody specific to a protein of <i>M.tuberculosis</i> which did not cross-react with the vaccine strain <i>M.bovis</i> BCG.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, der jährlich über 3 Millionen Menschen zum Opfer fallen. Es gibt zwar sowohl einen Impfstoff, als auch verschiedene Diagnose- und Therapieverfahren, doch die Effektivität all dieser Maßnahmen bedarf, angesichts der wieder steigenden Zahl der Erkrankungsfälle, dringend einer Verbesserung. Ein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Charakterisierung von Antigenen, die frühzeitig während einer Infektion sekretiert werden, da diese den ersten Kontakt des Immunsystems mit dem Erreger herstellen. Das in dieser Arbeit behandelte 40 kD-Antigen liegt <i>in vivo</i> als Hexamer vor, und ist trotz des hohen Molekulargewichts und des Fehlens einer Signalsequenz bereits nach wenigen Tagen des Wachstums extrazellulär zu finden. Es stellt funktionell eine L-Alanin Dehydrogenase dar und reagiert mit dem gegen dieses Protein gerichteten monoklonalen Antikörper HBT-10. HBT-10 war der erste bekannte Antikörper, der spezifisch für ein Protein von <i>M. tuberculosis</i> ist und nicht mit dem Impfstamm <i>M. bovis</i> BCG kreuzreagiert.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

L-ALANIN DEHYDROGENASE VON MYCOBACTERIUM MARINUM

Das in dieser Arbeit behandelte 40 kD-Antigen stellt in vielerlei Hinsicht ein interessantes Objekt für eingehende Studien dar.

Das Antigen war bereits in einen Expressionsvektor für *Escherichia coli* kloniert worden (Konrad & Singh, unveröffentlicht). Es sollte deshalb die Expression und die Aufreinigung des rekombinanten Proteins optimiert werden. Mit einer homogenen Proteinfraktion sollten dann die entscheidenden biochemischen Parameter des Enzyms bestimmt werden. Aus solchen Daten lassen sich erfahrungsgemäß Rückschlüsse auf die physiologische Funktion eines Enzyms ziehen. Es stellte sich hierbei die Frage, ob die hypothetische Aufgabe des Enzyms bei der Zellwandbiosynthese unterstrichen oder widerlegt werden kann. Im Falle einer Widerlegung sollten andere mögliche Funktionen eruiert werden.

Zudem können sich aus der Biochemie Ansatzpunkte für eine gezielte Beeinflussung des Enzyms *in vivo* ergeben. In diesem Zusammenhang ist erneut die physiologische Funktion der Schlüsselpunkt aller Anstrengungen. Wenn das Antigen für das Bakterium eine essentielle Rolle spielen sollte, dann könnten sich durch gezielte Versuche das Gen oder das Protein auszuschalten Möglichkeiten ergeben, den Tuberkulose-Erreger an einem definierten Punkt am Wachstum zu hindern. Das Protein wäre dann ideales *drug target*. Sollte das 40 kD-Antigen zudem, wie postuliert (Delforge *et al.*, 1993), einen Virulenzfaktor darstellen, dann könnte durch solche Unternehmungen Einfluß auf die natürliche Virulenz des Bakteriums genommen werden. Durch verschiedene Ansätze sollte deshalb auch dieser Punkt überprüft werden.

- 2 -

Die Möglichkeit, mittels des mAb HBT-10 die Stämme *M.tuberculosis* und *M.bovis* BCG zu diskriminieren, ermöglicht es Verfahren zu entwickeln, die eine Infektion von einer Impfung unterscheiden können. Dies ist mit den gebräuchlichen Screeningverfahren, dem PPD- oder dem Mantoux-Test, nicht möglich (Bass Jr. *et al.*, 1990; Huebner *et al.*, 1993). Durch die Analyse der Verbreitung des Gens bzw. des Genprodukts sollte die Grundlage dafür geschaffen werden, eine rationelle Verfahrensentwicklung für einen solchen Test zu ermöglichen. Zudem sollte untersucht werden, ob das Vorhandensein eines funktionellen Enzyms mit irgendwelchen anderen Parametern korreliert. Insbesondere auf taxonomische und virulente Zusammenhänge wurde hierbei Wert gelegt. Auch bestimmte natürliche Lebensweisen oder der Eintritt in bestimmte Wachstumsphasen könnten mit der Alanin Dehydrogenase in Zusammenhang stehen. Diesen Fragen sollte auf den Grund gegangen werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Lebendes Material

2.1.1 Bakterien

2.1.1.1 *E.coli* Stämme

Der Stamm *Escherichia coli* wurde verwendet um die Expression des rekombinanten 40 kD-Antigens zu optimieren (Tab. 2.1). Zudem wurden in ihm bereits klonierte mykobakterielle Antigene überproduziert (Tab. 2.2).

Tab. 2.1 : Benutzte Expressionsstämme und deren relevante Eigenschaften

Stamm	Genotyp und relevanter Phänotyp	Herkunft / Referenz
<i>E.coli</i> CAG 629	<i>lac(am) pho(am) trp(am) supC^{ts} rpsL mal(am) lon</i> <i>hlpR165-Tn10(Tet^R)</i>	C.Gross
<i>E.coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169(ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>	Hanahan (1983)
<i>E.coli</i> TG2	<i>supE <i>hsd</i>Δ5 <i>thi</i>Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>srl-recA</i>)306::<i>Tn10</i>(Tet^R)</i> <i>F'(<i>traD36 proA⁺ lacI^q lacZM15</i>)</i>	Sambrook et al. (1989)
<i>E.coli</i> SURE	<i>hsdR mcrA mcrB mvr endA supE44 thi-1 λ- gyrA96</i> <i>relA1 lac recB recJ sbcC umuC uvrC (F'<i>proAB lacI^qZ</i></i> <i>ΔM15 Tn10(Tet^R))</i>	Stratagene
<i>E.coli</i> BL 321	<i>rnc105 nadB⁺ purI⁺</i>	Studier (1975)
<i>E.coli</i> N 4830	<i>su^o his ilv galKΔ8 ΔchlD-<i>pgl</i> (λ ΔBam N⁺ <i>cl_{ts857}</i> ΔHI)</i>	Gottesman et al. (1980)
<i>E.coli</i> 538	Genotyp unbekannt	Bayer AG

Tab. 2.2 (1/2) : Produzenten mykobakterieller Antigene und deren Charakteristika

Es ist angegeben, welches Antigen von den jeweiligen Stämmen produziert wird. Die beiden letzten Spalten geben die Anzuchtbedingungen wieder (siehe auch 2.5.2).

Stamm	Herkunft / Referenz(en)	Produkt	Antibiotika	Induktion
<i>E.coli</i> BL21 (pKAM1301)	J. van Embden	GST-36 kD-Antigen, <i>M.leprae</i>	Ap	IPTG
<i>E.coli</i> BL21/plys5 (pKAM3601)	J. van Embden	70 kD-Antigen, <i>M.leprae</i>	Ap + Cm	IPTG
<i>E.coli</i> CAG629 (pMS9-2)	Singh <i>et al.</i> (1992)	38 kD-Antigen, <i>M.tuberculosis</i>	Ap	Hitze
<i>E.coli</i> CAG629 (pMS14-1)	Cherayil & Young (1988) Dale & Patki (1990) Singh <i>et al.</i> (unveröff.)	28 kD-Antigen, <i>M.leprae</i>	Ap	Hitze
<i>E.coli</i> M15 (pHISK16 + pREP4)	Verbon <i>et al.</i> (1992) Vordermeier <i>et al.</i> (1993)	16 kD-Antigen, <i>M.tuberculosis</i>	Ap	IPTG
<i>E.coli</i> M1697	V. Mehra	His-30 kD-Antigen, <i>M.tuberculosis</i>	Ap + Km	IPTG
<i>E.coli</i> M1698	V. Mehra	His-30 kD-Antigen, <i>M.leprae</i>	Ap + Km	IPTG
<i>E.coli</i> POP (pKAM2101)	J. van Embden	70 kD-Antigen, <i>M.tuberculosis</i>	Ap	Hitze
<i>E.coli</i> POP (pRIB1300)	Thole <i>et al.</i> (1987) van Eden <i>et al.</i> (1988)	65 kD-Antigen, <i>M.bovis</i> BCG	Ap	Hitze
<i>E.coli</i> POP (pZW1003)	Mehra <i>et al.</i> (1986) van der Zee <i>et al.</i> (unveröff.)	65 kD-Antigen, <i>M.leprae</i>	Ap	Hitze
<i>E.coli</i> TB1 (pKAM1101)	di Guan <i>et al.</i> (1987) Maina <i>et al.</i> (1988) Thole <i>et al.</i> (1990)	MBP-36 kD-Antigen, <i>M.leprae</i>	Ap	Hitze

Tab. 2.2 (2/2) : Produzenten mykobakterieller Antigene und deren Charakteristika

Es ist angegeben, welches Antigen von den jeweiligen Stämmen produziert wird. Die beiden letzten Spalten geben die Anzuchtbedingungen wieder (siehe auch 2.5.2).

Stamm	Herkunft / Referenz(en)	Produkt	Antibiotika	Induktion
<i>E.coli</i> TB1 (pKAM4101)	J. van Embden	MBP-2nd 65 kD-Antigen, <i>M.leprae</i>	Ap	Hitze
<i>E.coli</i> TB21-8/2	Khanolar-Young <i>et al.</i> (1992) Mehra <i>et al.</i> (1992)	MBP-10 kD-Antigen, <i>M.tuberculosis</i>	Ap	IPTG
<i>E.coli</i> TG2 - 50/55 Sal large	C.Espitia; M.Singh	50/55 kD, large frag., <i>M.tuberculosis</i>	Ap	IPTG

2.1.1.2 Mykobakterielle Stämme

Tab. 2.3 (1/3) : Benutzte Mykobakterien und deren Herkunft

Stamm	Abkürzung	Genaue Bezeichnung, Herkunft
<i>M.africanum</i> 1	Afr1	<i>M.africanum</i> nr.5544, RIV
<i>M.asiaticum</i> 1	Asi1	<i>M.asiaticum</i> 3250, Portaals
<i>M.avium</i> 1	Avi1	<i>M.avium</i> Myc 3875, Serotype 2, RIV
<i>M.bovis</i> 3	Bov3	<i>M.bovis</i> nr.8316, RIV
<i>M.bovis</i> BCG 2	BCG2	<i>M.bovis</i> Copenhagen, Serumsinstitut Copenhagen
<i>M.bovis</i> BCG 4	BCG4	<i>M.bovis</i> BCG P ₃ , RIV
<i>M.chelonae</i> 7	Che7	<i>M.chelonae</i> 1490, P.Dirven
<i>M.flavescens</i> 1	Fla1	<i>M.flavescens</i> ATCC 14474, RIV
<i>M.fortuitum</i> 11	For11	<i>M.fortuitum</i> ATCC 6841, RIV
<i>M.gastri</i> 1	Gas1	<i>M.gastri</i> ATCC 25220, RIV
<i>M.gordonae</i> 3	Gor3	<i>M.gordonae</i> 8960, Portaals

- 6 -

Tab. 2.3 (2/3) : Benutzte Mykobakterien und deren Herkunft

Stamm	Abkürzung	Genaue Bezeichnung, Herkunft
<i>M.intracellulare</i> 1	Int1	<i>M.intracellulare</i> 6997, ATCC 15385, Portzals
<i>M.intracellulare</i> 5	Int5	<i>M.intracellulare</i> IWG MT3, RIV
<i>M.kansasii</i> 1	Kan1	<i>M.kansasii</i> Myc 1012, RIV
<i>M.lufu</i> 1	Luf1	<i>M.lufu</i> 219, RIV
<i>M.marinum</i> 3	Mar3	<i>M.marinum</i> L66, Portzals
<i>M.microti</i> 1	Mic1	<i>M.microti</i> nr.1278, Portzals
<i>M.nonchromogenium</i> 1	Non1	<i>M.nonchromogenium</i> ATCC 25145, RIV
<i>M.parafortuitum</i> 1	Paf1	<i>M.parafortuitum</i> nr.6999, Portzals
<i>M.peregrinum</i> 1	Per1	<i>M.peregrinum</i> , Patient Bakker, TB6849, Antonie Ziekenhuis
<i>M.phlei</i> 1	Ph1	<i>M.phlei</i> 258 (Ph), Portzals
<i>M.phlei</i> 4	Ph4	<i>M.phlei</i> Weybridge R82, Tony Eger
<i>M.scrofulaceum</i> 1	Scr1	<i>M.scrofulaceum</i> Myc 3442, RIV
<i>M.scrofulaceum</i> 8	Scr8	<i>M.scrofulaceum</i> Myc 6672, RIV
<i>M.simiae</i> 1	Sim1	<i>M.simiae</i> 784, Tony Eger
<i>M.smegmatis</i> 1	Sme1	<i>M.smegmatis</i> ATCC 14460, RIV
<i>M.smegmatis</i> 3	Sme3	<i>M.smegmatis</i> 8070, Portzals
<i>M.terrae</i> 2	Ter2	<i>M.terrae</i> , RIV
<i>M.thermoresistibile</i> 1	The1	<i>M.thermoresistibile</i> nr.7001, Portzals
<i>M.triviale</i> 1	Tri1	<i>M.triviale</i> 8067, Portzals
<i>M.tuberculosis</i> H37R _v	H37R _v	<i>M.tuberculosis</i> H37R _v , RIV
<i>M.tuberculosis</i> H37R _a	H37R _a	<i>M.tuberculosis</i> H37R _a , nr.19629, RIV
<i>M.tuberculosis</i> 1	Tub1	<i>M.tuberculosis</i> 4514, RIV
<i>M.tuberculosis</i> 49	Tub49	<i>M.tuberculosis</i> C ₃ , Sang-Hae Cho, Südkorea
<i>M.tuberculosis</i> 60	Tub60	<i>M.tuberculosis</i> S ₂ , Sang-Hae Cho, Südkorea

- 7 -

Tab. 2.3 (3/3) : Benutzte Mykobakterien und deren Herkunft

Stamm	Abkürzung	Genaue Bezeichnung, Herkunft
<i>M.tuberculosis</i> 118	Tub118	<i>M.tuberculosis</i> Myc 16293, Hannoufi
<i>M.tuberculosis</i> 130	Tub130	<i>M.tuberculosis</i> , patient yy, Strichcode 3.1265, Dr.Bijlmer, Den Haag
<i>M.tuberculosis</i> 132	Tub132	<i>M.tuberculosis</i> Myc 16770, RIV
<i>M.tuberculosis</i> 145	Tub145	<i>M.tuberculosis</i> 416138N, Patient N.Wielaart, Reg.Nr. 7.796.267, WKZ, Utrecht
<i>M.tuberculosis</i> 146	Tub146	<i>M.tuberculosis</i> , Abdi Hussein
<i>M.tuberculosis</i> 163	Tub163	<i>M.tuberculosis</i> 925, Patientenisolat Nr. 32, INH>1, Str ^R , Rif ^S , Eth ^S
<i>M.ulcerus</i> 1	Ulc1	<i>M.ulcerus</i> 932, Portaals
<i>M.vaccae</i> 3	Vac3	<i>M.vaccae</i> ATCC 25950, RIV
<i>M.xenopi</i> 7	Xen7	<i>M.xenopi</i> code 132, Patient Alois Necas, H.Kristanpul, Prag

2.1.1.3 Andere Bakterienstämme

Tab. 2.4 : Weitere benutzte Bakterienstämme

Stamm	Herkunft
<i>Listeria monocytogenes</i> EGB	Andreas Lignau
<i>Listeria innocua</i>	Andreas Lignau
<i>Nocardia asteroides</i> 702774	Juul Bruins
<i>Rodococcus equi</i> nr.10P388	VMDC, Utrecht

-8- 2.1.2 Zellkultur

Benutzt wurde die Mäuse Makrophagen Zelllinie J774. Diese Zelllinie war ursprünglich aus einem Tumor einer weiblichen BALB/c Maus etabliert worden (Ralph & Nakoinz, 1975). J774 wird für Phagozytose-Assays, zur Produktion von IL-1 und für vielfältige biochemische Untersuchungen benutzt. Sie besitzt Rezeptoren für Immunglobuline und Komplement. Desweiteren produziert J774 Lysozym in großen Mengen und sekretiert IL-1 konstitutiv (Ralph & Nakoinz, 1976; Snyderman *et al.*, 1977). Die Aufnahme von Bakterien erfolgt durch Phagozytose. Direkte Zytolyse von Fremdorganismen ist relativ selten.

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

pJLA604Not

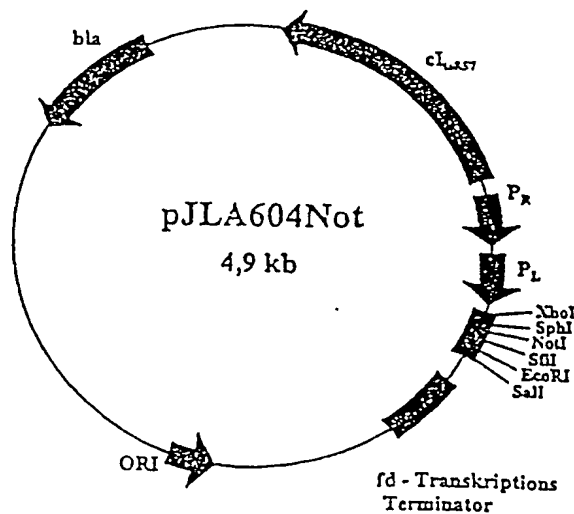


Abb. 2.1 : Das Plasmid pJLA604Not und seine relevanten funktionellen Abschnitte

Dieses 4,9 kb große Plasmid, ein Derivat von pJLA 604 (Schauder *et al.*, 1987), wurde als Expressionsvektor verwendet (Abb. 2.1). Das Plasmid pJLA604Not (Konrad & Singh, unveröffentlicht) unterscheidet sich von pJLA604 dadurch, daß die *NdeI*-

- 9 -

Schnittstelle entfernt, und statt dessen eine *NotI*-Schnittstelle eingebaut wurde. Das Leseraster der Translation beginnt mit dem ATG-Codon der *SphI*-Schnittstelle. Die Transkription startet an den Lambda-Promotoren P_R und P_L , wird jedoch bei Temperaturen von 28-30°C durch das cI_{857} -Genprodukt effektiv reprimiert. Induktion wird durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C erreicht. Bei dieser Temperatur wird der temperatursensible Lambda-Repressor inaktiv und kann die Transkription nicht mehr reprimieren. Die Transkription endet am *fd*-Terminator. Zudem besitzt der Vektor die *atpE* Translations-Initiationsregion (TIR) von *E.coli*. Dieser Abschnitt ist sehr nützlich für die Initiation der Translation, da er nur wenig störende Sekundärstrukturen besitzt und dadurch eine hohe Expressionsrate gewährleistet (McCarthy *et al.*, 1986). Als Selektionsmarker verfügt das Plasmid über das β -Lactamase-Gen, das für eine Ampicillinresistenz codiert.

Als negatives Kontrollplasmid wurde auch pJLA603 verwendet, das bis auf wenige Basen in der Klonierungsstelle mit pJLA604 identisch ist.

pMSK12

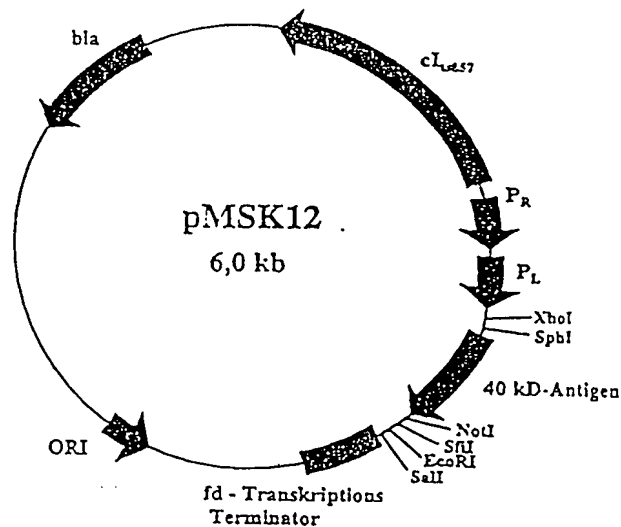


Abb. 2.2 : Das Plasmid pMSK12 und seine relevanten funktionellen Abschnitte

- 10 -

Dies ist ein Derivat des Plasmids pJLA604Not, bei dem zwischen die *SphI*- und die *NotI*-Schnittstelle das 40kD-Antigen von *Mycobacterium tuberculosis* kloniert wurde (Abb. 2.2; Konrad & Singh, unveröffentlicht).

2.2.2 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide (Tab. 2.5) wurden von Frau Astrid Hans (GBF, Braunschweig) an einem 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems) hergestellt. Gereinigt wurden die Oligonukleotide mit einer Oligonucleotide Purification Cartridge (Applied Biosystems).

Tab. 2.5 : Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Orientierung
AlaDH-F1	5'-ATGCGCGTCGGTATTCCG-3'	forward
AlaDH-F1+	5'-GCGCGTCGGTATTCCGACCG-3'	forward
AlaDH-F2	5'-GAGACCAAAAACAACGAA-3'	forward
AlaDH-F4	5'-GAATTCCCATCAGCAATCTTGCAGA-3'	forward
AlaDH-F5	5'-GCCCCGATGAGCGAAGTC-3'	forward
AlaDH-F6	5'-GGGGCCGTCCTGGTGCC-3'	forward
AlaDH-F7	5'-GACGTCGACCTACGCGCTGAC-3'	forward
AlaDH-R1	5'-CTCGGTGAACGGCACCCC-3'	reverse
AlaDH-R2	5'-GGCCAGCACGCTGGCGGG-3'	reverse
AlaDH-R3	5'-CACCCGTTCCGACAGTAA-3'	reverse
AlaDH-R4	5'-CGCGGCCGACATCATCGC-3'	reverse
AlaDH-R5	5'-GGCCGACATCATCGCTTCCC-3'	reverse
AlaDH-R6	5'-CGAGACTAATTTGGGTGCCTTGGC-3'	reverse
AlaDH-R7	5'-ATTTGGGTGCCTTGGC-3'	reverse
AlaDH-RM	5'-GGCGGCGAGTCGACCGGC-3'	reverse

- 11 -

Die Lokalisation der Oligos auf dem *AlaDH*-Gen ist in Abb. 2.3 schematisiert.

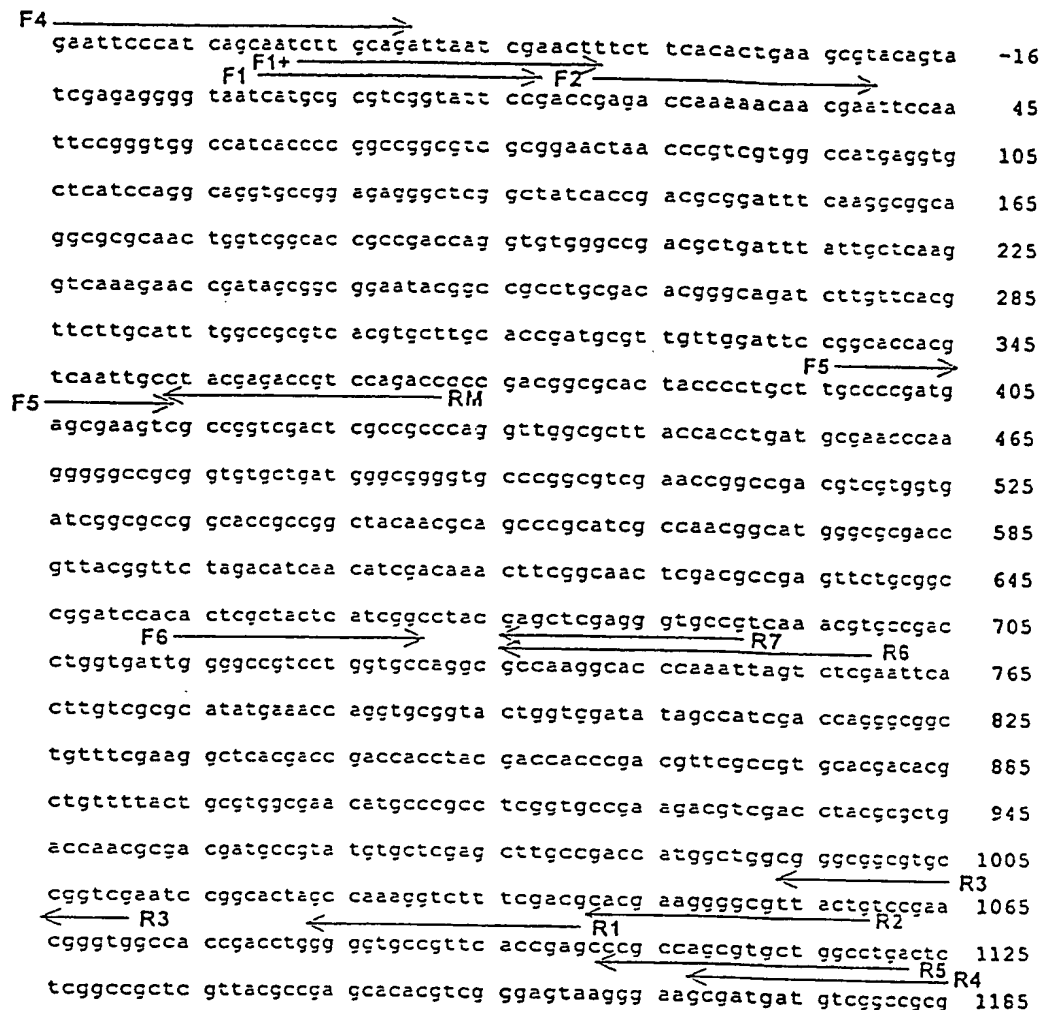


Abb. 2.3 : Die verwendeten Oligos und ihre Lage auf dem *AlaDH*-Gen

2.3 Rezepturen

Alle unter diesem Punkt beschriebenen Lösungen wurden weitestgehend nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

2.3.1 Nährmedien

LB

10 g Bacto-Trypton (Difco), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Difco), 10 g NaCl
ad 1000 ml H₂O, pH 7,0, autoklavieren

- 12 -

IB

12 g Bacto-Trypton (Difco), 24 g Bacto-Hefeextrakt (Difco), 4 ml Glycerin (87 %), 2,31 g KH_2PO_4 , 12,54 g K_2HPO_4

ad 1000 ml H_2O , die Phosphatlösungen werden getrennt von den anderen Komponenten autoklaviert und hinterher zugemischt

SOC

2 % Bacto-Trypton (Difco), 0,5 % Bacto-Hefeextrakt (Difco), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose

ad 1000 ml H_2O , pH 7,0, die Glucose wird getrennt von den anderen Komponenten autoklaviert und hinterher zugegeben

LÖWENSTEIN

Benutzt wurden gebrauchsfertige Coletsos Ossein Schrägagarrröhrchen (Sanofi Diagnostics Pasteur).

FESTMEDIEN:

Zur Herstellung von Platten (90 mm, Greiner) der oben beschriebenen Nährmedien wurde der jeweiligen Rezeptur 1,5% Agar beigemischt.

ANTIBIOTIKA

Antibiotika wurden den Flüssigmedien kurz vor Gebrauch aus Stammlösungen zugegeben. Bei Herstellung von Festmedien wurde mit der Zugabe gewartet, bis die Lösung nach dem Autoklavieren handwarm war. Benutzt wurden die in Tab. 2.6 aufgeführten Antibiotika.

Tab. 2.6 : Benutzte Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen

Antibiotika	Endkonzentration	gelöst in
Ampicillin	100 µg/ml	Wasser
Chloramphenicol	20 µg/ml	Ethanol
Gentamicin	100 µg/ml	gebrauchsfertig (Sigma)
Kanamycin	30 µg/ml	Wasser

2.3.2 Pufferlösungen

L-PUFFER: 50 mM Tris base, 10 mM EDTA, pH 6,8, autoklavieren

TE: 10 mM Tris base, 1 mM EDTA, pH 7,4, autoklavieren

TAE: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0, autoklavieren

TBE: 89 mM Tris base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0, autoklavieren

TBS: 50 mM Tris base, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,4, autoklavieren

TBS-TWEEN: TBS +0,05% Tween-20

PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,0, autoklavieren

2.6.4 Alanin Dehydrogenase Assays

2.6.4.1 Qualitativer Assay

Der qualitative Nachweis der AlaDH beruht auf einer Reihe von Redoxreaktionen, gemäß folgendem Reaktionsschema (Inagaki *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1992):

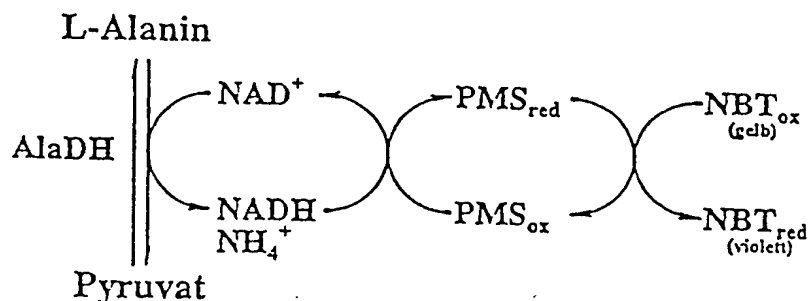


Abb. 2.4 : Prinzip des Alanin Dehydrogenase - Assays

Das violette Endprodukt ist hierbei sehr gut mit dem bloßen Auge zu erkennen. Dieser Assay wurde einerseits zum schnellen Screening von FPLC-Fractionen und andererseits zur Demonstration von AlaDH-Aktivität in nativen Proteingelen benutzt.

Basis dieses Assay ist ein Reaktionsmix bestehend aus 1/2 Vol. 0,5 M Glycin-KOH, pH 10,2 und je 1/8 Vol. 0,5 M L-Alanin, 6,25 mM NAD⁺, 2,4 mM NBT und 0,64 mM PMS.

Zur Analyse von Proteinfractionen wurde der Substratmix 1:1 mit der zu testenden Lösung versetzt. Native Gele wurden nach der Elektrophorese direkt in 10 ml Substratmix inkubiert.

Eine positive Reaktion ist nach spätestens 5 min zu erkennen.

2.6.4.2 Semiquantitativer Assay

Dieser Assay wurde zur Untersuchung von AlaDH-Aktivitäten in Mykobakterien verwendet.

Die Mykobakterien wurden auf Löwenstein-Medium angezogen. Mit der Impföse wurden Bakterien von den Schrägagar-Röhrchen abgenommen, in Wasser resuspendiert und auf eine Trübung äquivalent zu einem McFarland Standard Nr.5 eingestellt. Zur Trennung von Zellaggregaten wurden die Suspensionen für 10 min im Ultraschallbad behandelt.

Anschließend wurden die Zellen 1:1 mit Reaktionsmix (siehe 2.6.4.1) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 20.000 g wurde die Absorption des Überstandes gegen den Blindwert gemessen.

Als Referenzmessung diente ein Ansatz, dem kein L-Alanin zugesetzt war.

Eine Absorptionsänderung von einer Einheit pro Minute in diesem Test entspricht etwa einer Absorptionsänderung von drei Einheiten pro Minute beim quantitativen Assay (Messung bei 340 nm, siehe 2.6.4.3).

2.6.4.3 Quantitativer Assay

Bei diesem Assay wurde direkt die quantitative Änderung des NADH-Gehaltes bei 340 nm gemessen.

Die Standardreaktionsansätze hatten ein Volumen von 1 ml. Die Zusammensetzung ist in Tab. 2.7 gezeigt. Die Absorption wurde über 10 min hinweg bei 37°C und 340 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient ϵ von NADH beträgt bei 340 nm $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

Die Standardansätze wurden zur Bestimmung der biochemischen Eigenschaften des Enzyms wie jeweils im Text angegeben variiert. Jeder dargestellte Meßpunkt stellt den Mittelwert aus mindestens zwei, in der Regel aber drei, unabhängigen Messungen dar.

Eine AlaDH-Einheit ist als die Enzymmenge definiert, die in einer Minute die Bildung von 1 μmol NADH in der oxidativen Desaminierung katalysiert.

Tab. 2.7 : Zusammensetzung des quantitativen AlaDH-Assays

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die oxidative Desaminierung ist links, die für die reduktive Aminierung rechts gezeigt.

Oxidative Desaminierung	Reduktive Aminierung
125 mM Glycin-KOH, pH 10,2	1 M NH_4Cl / NH_4OH , pH 7,4
100 mM L-Alanin	20 mM Pyruvat
1,25 mM NAD^+	0,5 mM NADH

2.6.5 Densitometrie

Densitometrie wurde benutzt um eine Quantifizierung des Expressionslevels der AlaDH zu machen. Desweiteren wurden hiermit die Signale der Epitopkartierung quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

Die Durchführung erfolgte mit einem Personal Densitometer (Molecular Dynamics) mit der Software Image Quant (Molecular Dynamics).

3.5 Die Verbreitung der Alanin Dehydrogenase innerhalb der Mykobakterien

Sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene, sollte als nächstes untersucht werden, in welchen Mykobakterien eine Alanin Dehydrogenase vorhanden ist. Ausgehend von der Virulenz war hierbei die Fragestellung, ob die AlaDH-Aktivität mit dieser Eigenschaft korreliert.

3.5.1 *In vivo* AlaDH-Aktivität

Da AlaDH-Aktivität in der Mikrowelt eher die Ausnahme als die Regel darstellt, war es interessant zu hinterfragen, ob dieses Enzym innerhalb der Mykobakterien ubiquitär ist, oder ob es auf bestimmte Spezies und Stämme beschränkt ist. Dadurch können dann wiederum Rückschlüsse auf Fragen gezogen werden wie :

- ✍ Haben AlaDH produzierende Stämme Gemeinsamkeiten in der Lebensweise ?
- ✍ Induziert eine bestimmte Wachstumsweise oder - phase die AlaDH-Produktion ?
- ✍ Wie erfolgt die Regulation der AlaDH ?
- ✍ Können andere Stoffwechselwege die von der AlaDH katalysierte Reaktion ersetzen ?
- ✍ Welchen Phänotyp müssten *AlaDH* Mutanten zeigen ?

Es wurden deshalb alle verfügbaren Stämme auf Produktion von AlaDH-Aktivität hin untersucht. Das Repertoire umfasste insgesamt 44 mykobakterielle Stämme, die 29 verschiedene Spezies repräsentieren. Zudem wurden die beiden mit den Mykobakterien eng verwandten Stämme *Nocardia asteroides* und *Rhodococcus equi* getestet.

Um die im Testsystem gemessenen Aktivitäten miteinander vergleichen zu können, wurden alle Bakteriensuspensionen auf eine Dichte eingestellt, die der Trübung eines McFarland Standards Nr.5 entspricht. Die Stämme befanden sich zum Zeitpunkt der Messung in der späten exponentiellen Phase.

Neben der AlaDH-Messung wurde auch eine Messung durchgeführt, bei der im Reaktionsansatz L-Alanin fehlte. Die Aktivität dieses Ansatzes ist ein Maß für andere parallel ablaufende NAD⁺-reduzierende Prozesse. Die Differenz zwischen diesem Ansatz und dem Standardansatz entspricht der Netto-AlaDH-Aktivität (ΔA_{595} -Wert).

Gemäß der gemessenen Aktivitäten lassen sich die untersuchten Stämme in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe ist die der stark-positiven Stämme (Tab.3.11). In dieser Gruppe sind die Stämme zusammengefasst, die eine AlaDH-Aktivität von mehr als 0,5 ΔA_{595} -Einheiten im benutzten Testsystem aufweisen.

Tab 3.11 : Stämme mit stark-positiver AlaDH-Aktivität

Die Durchführung dieses Assays ist in 2.6.4.2 beschrieben.

Stamm	AlaDH-Aktivität [ΔA_{595}]
<i>M.marinum</i> 3	2,327
<i>M.chelonae</i> 7	1,842
<i>M.microti</i> 1	0,919
<i>M.tuberculosis</i> H37R _v	0,592

Als stark-positiv klassifiziert wurden die beiden für Fische pathogenen Stämme *M.chelonae* und *M.marinum*, sowie die beiden ebenfalls pathogenen Stämme *M.microti* und *M.tuberculosis* H37R_v, letzteres ein virulenter Tuberkulose-Referenzstamm.

Die zweite Gruppe, die der mäßig-positiven Stämme, umfasst jene mit einer Aktivität zwischen 0,1 und 0,5 ΔA_{595} -Einheiten (Tab.3.12).

Tab.3.12 : Stämme mit mäßig-positiver AlaDH-Aktivität

Die Durchführung dieses Assays ist in 2.6.4.2 beschrieben.

Stamm	AlaDH-Aktivität [ΔA_{595}]	Stamm	AlaDH-Aktivität [ΔA_{595}]
<i>M.smegmatis</i> 3	0,375	<i>M.tuberculosis</i> 49	0,138
<i>M.ulcerus</i> 1	0,369	<i>M.tuberculosis</i> 130	0,118
<i>M.africanum</i> 1	0,287	<i>M.smegmatis</i> 1	0,116
<i>M.tuberculosis</i> 118	0,210	<i>M.tuberculosis</i> 132	0,111
<i>M.tuberculosis</i> 145	0,190	<i>M.tuberculosis</i> 146	0,111
<i>M.intracellulare</i> 1	0,155	<i>M.tuberculosis</i> 1	0,110

In dieser Gruppe finden sich, außer *M.smegmatis*, nur pathogene, klinische Isolate von *M.tuberculosis* und anderen Mykobakterien wieder. Beide getesteten Stämme von *M.smegmatis* zeigen jedoch auch sehr hohe NAD⁺-reduzierende Aktivitäten in Abwesenheit von L-Alanin. Es ist an dieser Stelle noch wichtig zu erwähnen, daß der Stamm *M.smegmatis* 1-2c (ein Derivat von *M.smegmatis* mc²⁶; Zhang *et al.*, 1991; Garbe *et al.*, 1994; von Dr. Peadar Ó Gaora, St.Mary's Hospital, London), ein Stamm für genetische Arbeiten in Mykobakterien, keine AlaDH-Aktivität zeigt, aber ebenfalls über eine hohe Hintergrundaktivität verfügt.

In der letzten Gruppe schließlich sind alle Stämme aufgeführt, die als für AlaDH-Aktivität negativ befunden wurden, d.h. die eine Aktivität von weniger als 0,1 ΔA_{595} -Einheiten aufweisen (Tab.3.13).

Tab.3.13 : Stämme ohne AlaDH-Aktivität

Die Durchführung dieses Assays ist in 2.6.4.2 beschrieben.

Stamm	AlaDH-Aktivität [ΔA_{595}]	Stamm	AlaDH-Aktivität [ΔA_{595}]
<i>N.asteroides</i> 1	0,048	<i>M.bovis</i> BCG 4	0,001
<i>M.flavescens</i> 1	0,042	<i>M.terrae</i> 2	0,001
<i>M.tuberculosis</i> H37R _a	0,032	<i>M.tuberculosis</i> 60	0
<i>M.nonchromogenium</i> 1	0,026	<i>M.tuberculosis</i> 163	0
<i>M.fortuitum</i> 11	0,022	<i>M.gastri</i> 1	0
<i>M.asiaticum</i> 1	0,021	<i>M.gordonae</i> 3	0
<i>M.bovis</i> BCG 2	0,013	<i>M.kansasii</i> 1	0
<i>M.lufu</i> 1	0,013	<i>M.parafortuitum</i> 1	0
<i>R.equi</i> 1	0,011	<i>M.perigrinum</i> 1	0
<i>M.bovis</i> 3	0,010	<i>M.phlei</i> 1	0
<i>M.scrofulaceum</i> 1	0,009	<i>M.phlei</i> 4	0
<i>M.intracellulare</i> 5	0,007	<i>M.scrofulaceum</i> 8	0
<i>M.thermosresistibile</i> 1	0,006	<i>M.simiae</i> 1	0
<i>M.avium</i> 1	0,002	<i>M.vaccae</i> 3	0
<i>M.triviale</i> 1	0,002	<i>M.xenopi</i> 7	0

Diese weitaus größte Gruppe umfaßt vor allem opportunistische und nicht-pathogene Stämme, sowie die beiden mit den Mykobakterien verwandten Stämme *Nocardia asteroides* und *Rhodococcus equi*. Ausnahme waren zwei klinische Tuberkulose-

Isolate, sowie der Erreger der Rinder-Tb, *M.bovis*, aber auch die beiden untersuchten Impfstämme von *M.bovis* BCG.

Eine graphische Darstellung der AlaDH-Aktivitäten ist in Abb. 3.16 nach phylogenetischen Gesichtspunkten geordnet wiedergegeben.

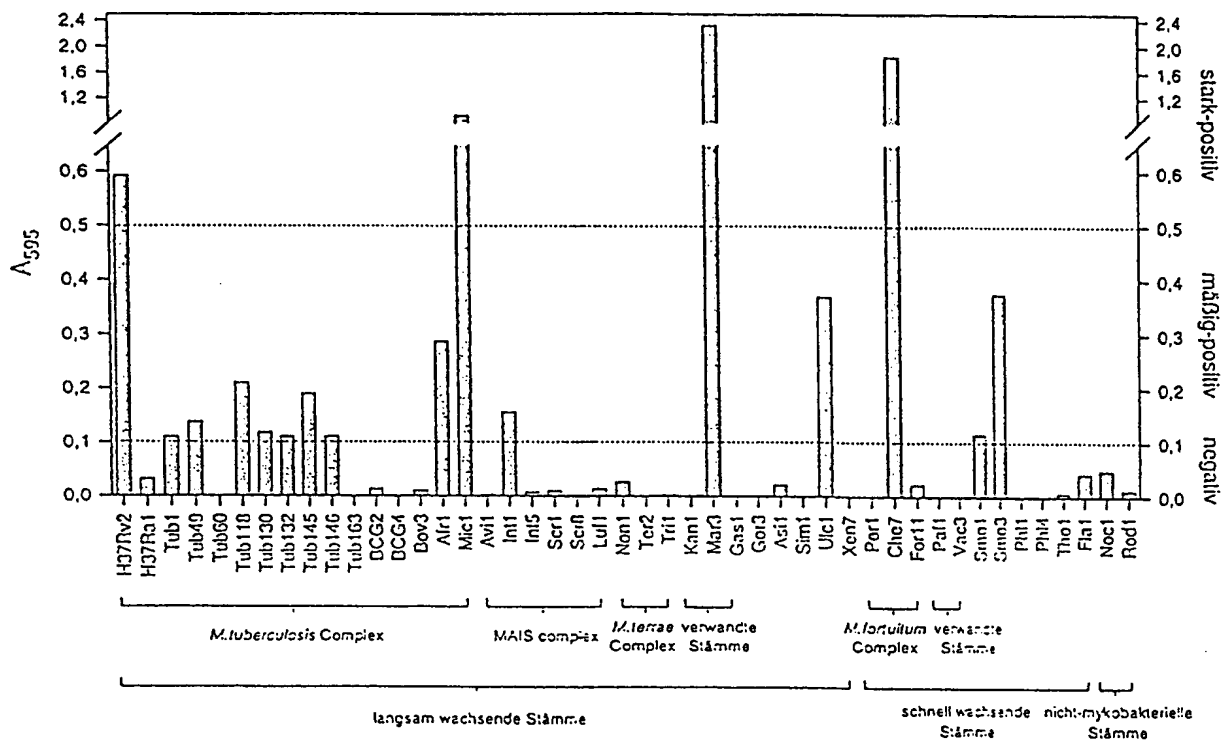


Abb. 3.16 : AlaDH-Aktivität im Reich der Mykobakterien

Die genaue Bezeichnung der einzelnen Stämme ist in Tab. 2.3 wiedergegeben. Die Angaben *schnell wachsend* bzw. *langsam wachsend* dürfen nicht streng genommen werden, sondern stellen vielmehr eine Tendenz innerhalb der gezeigten Gruppen dar.

Zusammenfassend läßt sich die Verbreitung von AlaDH-Aktivität innerhalb der Welt der Mykobakterien so beschreiben :

- ① Die mit Abstand höchste Aktivität zeigen die beiden für Fische pathogenen Stämme *M.chelonae* und *M.marinum*.

② Innerhalb der Stämme von *M.tuberculosis* ist eine Tendenz vorhanden, nach der mit abnehmender Virulenz auch die AlaDH-Aktivität abnimmt (H37R_v > klinische Isolate > H37R_a).

③ Alle als positiv klassifizierten Stämme sind virulent. Einzige Ausnahme ist *M.smegmatis*, das aber anhand seiner hohen Hintergrundaktivität leicht zu unterscheiden ist.

④ Nicht alle virulenten Stämme sind AlaDH positiv.

⑤ *M.tuberculosis* läßt sich mittels AlaDH-Aktivität vom Impfstamm *M.bovis* BCG unterscheiden.

3.5.2 Das Gen für die Alanin Dehydrogenase

3.5.2.1 Die ersten PCR-Fragmente

Nachdem nun die AlaDH-Aktivitäten innerhalb der verschiedenen Stämme quantifiziert worden waren, stellte sich als nächstes die Frage, warum einige Stämme das Enzym produzieren, andere aber nicht. Auch das Ausmaß der Expression unterscheidet sich selbst zwischen eng verwandten Arten teilweise deutlich.

Das Fehlen meßbarer Aktivität kann bis zu einem gewissen Grad eine Erklärung darin finden, daß sich nicht alle Stämme in der exakt selben Wachstumsphase befanden, da es sehr schwer ist alle Stämme parallel, im gleichen Stadium befindlich anzuziehen. Aber das Ausbleiben von Aktivität könnte auch einen Grund darin haben, daß sich genetische Änderungen auf die Expression des Gens auswirken. Diese Änderungen könnten im kodierenden oder im regulatorischen Bereich aufgetreten sein.

Um diese Tatsache zu überprüfen wurde versucht das *AlaDH*-Gen aus verschiedenen Stämmen mittels PCR ganz oder teilweise zu amplifizieren. Als Primer dienten hierzu

auf der Sequenz von *M.tuberculosis* H37R_v basierende Oligonukleotide (Andersen *et al.*, 1992; siehe Abschnitt 2.2.2, Tab. 2.5).

Die zum Nachweis der AlaDH verwendeten Primerpaare, die jeweils zu erwartende Länge der Produkte und die jeweils benutzten *Annealing*-Temperaturen der PCR sind in Tab. 3.14 zusammengefasst.

Tab.3.14 : Primerpaare zur Detektion der AlaDH in Mykobakterien

Die Sequenzen der Primer sind in Tab. 2.5 wiedergegeben.

Bezeichnung	Primer #1	Primer#2	Produkt	Temperatur
<i>Annabel</i>	AlaDH-F1	AlaDH-RM	433 bp	65°C
<i>Beatrice</i>	AlaDH-F1	AlaDH-R2	1102 bp	45°C
<i>Claudette</i>	AlaDH-F1	AlaDH-R3	1120 bp	55°C
<i>Désirée</i>	AlaDH-F1	AlaDH-R6	1072 bp	45°C
<i>Eleonore</i>	AlaDH-F1+	AlaDH-R1	1099 bp	55°C
<i>Francoise</i>	AlaDH-F1+	AlaDH-R2	1117 bp	50°C
<i>Giselle</i>	AlaDH-F2	AlaDH-R7	757 bp	35°C
<i>Helen</i>	AlaDH-F4	AlaDH-RM	1080 bp	55°C
<i>Isabelle</i>	AlaDH-F4	AlaDH-R6	1050 bp	55°C
<i>Jeanette</i>	AlaDH-F5	AlaDH-R1	507 bp	45°C
<i>Karen</i>	AlaDH-F5	AlaDH-R4	834 bp	45°C
<i>Larissa</i>	AlaDH-F6	AlaDH-R4	786 bp	55°C
<i>Melanie</i>	AlaDH-F6	AlaDH-R5	405 bp	55°C

Die ersten Versuche das Gen für die AlaDH in verschiedenen mykobakteriellen Spezies zu detektieren erfolgte mit dem Primerpaar *Annabel*. Das hierbei erhaltene Ergebnis war einigermaßen überraschend. Alle Stämme des *M.tuberculosis* Complex

- 24 -

zeigten das erwartete Fragment von 433 bp. Darüber hinaus war bei all diesen Stämmen ein zusätzliches Fragment von etwa 900 bp amplifiziert worden (Abb.3.17).

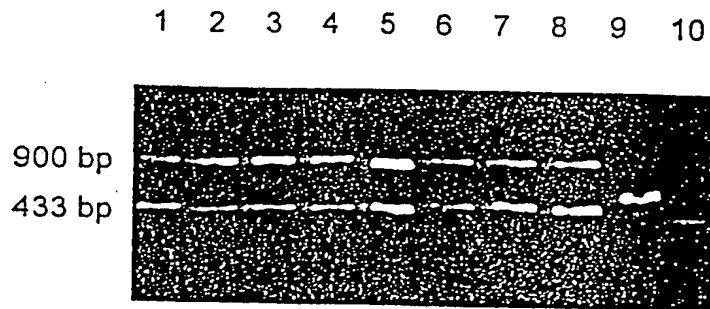


Abb. 3.17 : PCR verschiedener Stämme mit dem Primerpaar Annabel.

Gefahren wurden bei diesen PCR's jeweils 40 Zyklen mit der Abfolge : *melting* 2 min bei 96°C, *annealing* 2 min bei 65°C und *extension* 3 min bei 72°C. Die MgCl₂-Konzentration betrug 1,5 mM.

Bahn 1 : *M.tuberculosis* H37R_v

Bahn 2 : *M.tuberculosis* H37R_a

Bahn 3 : *M.tuberculosis* 1

Bahn 4 : *M.bovis* 3

Bahn 5 : *M.bovis* BCG 2

Bahn 6 : *M.bovis* BCG 4

Bahn 7 : *M.africanum* 1

Bahn 8 : *M.microti* 1

Bahn 9 : *M.marinum* 3

Bahn 10 : *M.chelonae* 7

Wie sich herausstellen sollte, war dieses zweite Fragment ebenfalls ein Teil des *AlaDH*-Gens, das durch Anlagerung des Primers *AlaDH*-RM an einer weiter C-terminal gelegenen Stelle entstanden ist. Durch Erhöhung der *Annealing*-Temperatur bei der PCR von 65 auf 69°C konnte dieses zweite Fragment unterdrückt werden (siehe Abb. 3.18, Bahn 2 und 3).

Das eigentlich erstaunliche war jedoch das Erscheinen des amplifizierten Fragments in allen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex, unabhängig vom Vorhandensein von *AlaDH*-Aktivität.

Auch bei einigen anderen Stämmen konnte mit dem Primerpaar *Annabel* eines oder mehrere Fragmente amplifiziert werden. Allerdings waren die amplifizierten Banden meist nicht besonders stark, so daß sie in Anbetracht der 40 PCR-Zyklen als Hintergrund betrachtet werden können. Es handelt sich vermutlich um schwache unspezifische Reaktionen. Jedoch ist auch nicht auszuschliessen, daß aufgrund mangelnder Homologie zwischen den verschiedenen Spezies die PCR-Primer nicht optimal an die Zielsequenz binden konnten.

Die beiden fischpathogenen Stämme mit starker AlaDH-Aktivität, *M.marinum* und *M.chelonae*, zeigten bei der PCR mit dem Primerpaar *Annabel* ein deutlich unterschiedliches Verhalten. Während *M.marinum* ein Produkt von etwa 540 bp lieferte, war bei den gewählten Bedingungen mit dem Primerpaar *Annabel* bei *M.chelonae* kein Fragment zu erhalten (Abb. 3.17, Bahn 9 und 10).

3.5.2.2 Das AlaDH-Gen des *M.tuberculosis* Complex

Da die Präsenz des Gens für die AlaDH nun in allen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, wie man sich die Diskrepanz zu den gemessenen Aktivitäten erklären sollte.

Aus diesem Grunde wurde damit begonnen größere Fragmente des Gens zu amplifizieren. Aus *M.tuberculosis* H37R_v konnten alle in Tab. 3.15 aufgeführten Fragmente amplifiziert werden (ein Teil dieser Fragmente ist in Abb. 3.18 gezeigt). Von den anderen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex sind ebenfalls alle PCR-Reaktionen aus Tab. 3.15 die ausprobiert wurden, positiv verlaufen. Es wurde jedoch nicht mit jedem Stamm jede Reaktion nachvollzogen.

- 26 -

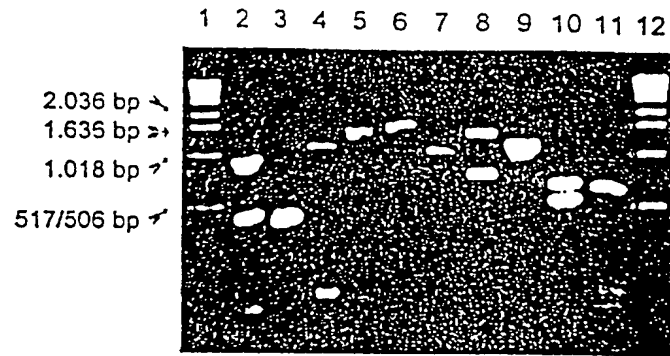


Abb. 3.18 : PCR-Produkte des Stammes *M.tuberculosis* H37R_v

Gefahren wurden bei diesen PCR's jeweils 40 Zyklen wie in Abb. 3.17 angegeben. Die *annealing*-Temperaturen sind, mit Ausnahme von Bahn 2 und 3, in Tab. 3.14 wiedergegeben. Die MgCl₂-Konzentration beim Primerpaar *Annabel* betrug 1,5 mM, die aller anderen Reaktionen 3 mM.

Bahn 1 : KBL

Bahn 2 : *Annabel*, 65°C

Bahn 3 : *Annabel*, 69°C

Bahn 4 : *Désirée*

Bahn 5 : *Eleonore*

Bahn 6 : *Francoise*

Bahn 7 : *Giselle*

Bahn 8 : *Helen*

Bahn 9 : *Isabelle*

Bahn 10 : *Larissa*

Bahn 11 : *Melanie*

Bahn 12 : KBL

Der von allen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex amplifizierte Bereich umfasst 1260 bp. Er beinhaltet den kompletten kodierenden Abschnitt für die AlaDH, sowie weitere 75 bp *upstream* und 63 bp *downstream*. Dieser Bereich wurde von allen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex komplett durchsequenziert (Abb. 3.19). Lediglich bei den letzten etwa 20 Basen schleichen sich Ungenauigkeiten ein. Der komplette restliche Bereich ist jedoch durch mehrfache Sequenzierungen abgesichert.

Es ist festzustellen, daß sämtliche Sequenzen bis auf drei Stellen komplett mit der publizierten Sequenz der AlaDH des λAA65-Klons (Andersen *et al.*, 1992) identisch sind.

- 27 -

*

40kD	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCACA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1
Tub1	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCACA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1
H37Rv	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCATA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1
H37Ra	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCATA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1
BCG4	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCACA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1
BCG2	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCACA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1
Bov3	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCACA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1
Afr1	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCACA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1
Mic1	-60	ATCTTGCAGA	TTAATCGAAC	TTTCTTCACA	CTGAAGCGTA	CAGTATCGAG	AGGGGTAATC	-1

Start		* * * * *						
40kD	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACGAAT	TCCAATTCGG	GGTGGCCATC	60
Tub1	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACG---	---AATTCCG	GGTGGCCATC	60
H37Rv	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACG---	---AATTCCG	GGTGGCCATC	60
H37Ra	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACG---	---AATTCCG	GGTGGCCATC	60
BCG4	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACG---	---AATTCCG	GGTGGCCATC	60
BCG2	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACG---	---AATTCCG	GGTGGCCATC	60
Bov3	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACG---	---AATTCCG	GGTGGCCATC	60
Afr1	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACG---	---AATTCCG	GGTGGCCATC	60
Mic1	1	ATGCGCGTCG	GTATTCCGAC	CGAGACCAA	AACAACG---	---AATTCCG	GGTGGCCATC	60

40kD	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120
Tub1	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120
H37Rv	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120
H37Ra	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120
BCG4	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120
BCG2	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120
Bov3	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120
Afr1	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120
Mic1	61	ACCCCGGCCG	GCGTCGCGGA	ACTAACCCGT	CGTGGCCATG	AGGTGCTCAT	CCAGGCAGGT	120

40kD	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180
Tub1	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180
H37Rv	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180
H37Ra	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180
BCG4	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180
BCG2	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180
Bov3	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180
Afr1	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180
Mic1	121	GCCGGAGAGG	GCTCGGCTAT	CACCGACGCG	GATTTCAAGG	CGGCAGGCGC	GCAACTGGTC	180

40kD	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240
Tub1	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240
H37Rv	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240
H37Ra	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240
BCG4	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240
BCG2	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240
Bov3	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240
Afr1	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240
Mic1	181	GGCACCGCCG	ACCAGGTGTG	GGCCGACGCT	GATTTATTGC	TCAAGGTCAA	AGAACCGATA	240

Abb. 3.19 (1/5): Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex

Siehe Legende Seite 101.

40kD	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	CAGATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300
Tub1	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	CAGATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300
H37Rv	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	CAGATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300
H37Ra	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	CAGATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300
BCG4	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	C-GATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300
BCG2	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	C-GATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300
Bov3	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	C-GATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300
Afr1	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	CAGATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300
Mic1	241	GCGGCGGAAT	ACGGCCGCCT	GCGACACGGG	CAGATCTTGT	TCACGTTCTT	GCATTTGGCC	300

40kD	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360
Tub1	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360
H37Rv	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360
H37Ra	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360
BCG4	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360
BCG2	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360
Bov3	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360
Afr1	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360
Mic1	301	GCGTCACGTG	CTTGACCGA	TGCGTTGTTG	GATTCCGGCA	CCACGTCAAT	TGCCTACGAG	360

40kD	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGACGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420
Tub1	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGACGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420
H37Rv	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGACGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420
H37Ra	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGACGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420
BCG4	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGACGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420
BCG2	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGAAGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420
Bov3	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGAAGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420
Afr1	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGACGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420
Mic1	361	ACCGTCCAGA	CCGCCGACGG	CGCACTACCC	CTGCTTGCCC	CGATGAGCGA	AGTCGCCGGT	420

40kD	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480
Tub1	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480
H37Rv	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480
H37Ra	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480
BCG4	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480
BCG2	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480
Bov3	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480
Afr1	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480
Mic1	421	CGACTCGCCG	CCCAGGTTGG	CGCTTACCAC	CTGATGCGAA	CCCAAGGGGG	CCGCGGTGTG	480

40kD	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540
Tub1	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540
H37Rv	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540
H37Ra	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540
BCG4	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540
BCG2	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540
Bov3	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540
Afr1	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540
Mic1	481	CTGATGGGCG	GGGTGCCCCG	CGTCGAACCG	GCCGACGTCG	TGGTGATCGG	CGCCGGCACC	540

Abb. 3.19 (2/5) : Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex

Siehe Legende Seite 101.

40kD	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600
Tub1	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600
H37Rv	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600
H37Ra	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600
BCG4	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600
BCG2	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600
Bov3	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600
Afr1	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600
Mic1	541	GCCGGCTACA	ACGCAGCCCC	CATCGCCAAC	GGCATGGGCG	CGACCGTTAC	GTTTCTAGAC	600

40kD	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660
Tub1	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660
H37Rv	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660
H37Ra	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660
BCG4	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660
BCG2	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660
Bov3	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660
Afr1	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660
Mic1	601	ATCAACATCG	ACAACTTCG	GCAACTCGAC	GCCGAGTTCT	GCGGCCG3AT	CCCACTCGC	660

40kD	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720
Tub1	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720
H37Rv	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720
H37Ra	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720
BCG4	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720
BCG2	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720
Bov3	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720
Afr1	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720
Mic1	661	TACTCATCGG	CCTACGAGCT	CGAGGGTGCC	GTCAAACGTG	CCGACCTGGT	GATTGGGGCC	720

40kD	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780
Tub1	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780
H37Rv	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780
H37Ra	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780
BCG4	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780
BCG2	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780
Bov3	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780
Afr1	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780
Mic1	721	GTCCTGGTGC	CAGGCGCCAA	GGCACCCAAA	TTAGTCTCGA	ATTCACTTGT	CGCGCATATG	780

40kD	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840
Tub1	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840
H37Rv	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840
H37Ra	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840
BCG4	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840
BCG2	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840
Bov3	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840
Afr1	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840
Mic1	781	AAACCAGGTG	CGGTACTGGT	GGATATAGCC	ATCGACCAGG	GCGGCTGTTT	CGAAGGCTCA	840

Abb. 3.19 (3/5) : Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex

Siehe Legende Seite 101.

- 30 -

40kD	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900
Tub1	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900
H37Rv	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900
H37Ra	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900
BCG4	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900
BCG2	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900
Bov3	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900
Afr1	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900
Mic1	841	CGACCGACCA	CCTACGACCA	CCCGACGTTT	GCCGTGCACG	ACACGCTGTT	TTACTGCGTG	900

40kD	901	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960
Tub1	901	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960
H37Rv	901	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960
H37Ra	90	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960
BCG4	90	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960
BCG2	901	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960
Bov3	901	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960
Afr1	901	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960
Mic1	901	GCGAACATGC	CCGCCTCGGT	GCCGAAGACG	TCGACCTACG	CGCTGACCAA	CGCGACGATG	960

40kD	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020
Tub1	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020
H37Rv	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020
H37Ra	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020
BCG4	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020
BCG2	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020
Bov3	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020
Afr1	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020
Mic1	961	CCGTATGTGC	TCGAGCTTGC	CGACCATG3C	TGGCGGGCGG	CGTGCCGGTC	GAATCCGGCA	1020

40kD	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080
Tub1	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080
H37Rv	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080
H37Ra	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080
BCG4	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080
BCG2	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080
Bov3	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080
Afr1	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080
Mic1	1021	CTAGCCAAAG	GTCTTTTCGAC	GCACGAAG3G	GCGTTACTGT	CCGAACGGGT	GGCCACCGAC	1080

40kD	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GA	Stop	
Tub1	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GACTCTCGGC	CGCTCGTTAC	1140
H37Rv	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GACTCTCGGC	CGCTCGTTAC	1140
H37Ra	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GACTCTCGGC	CGCTCGTTAC	1140
BCG4	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GACTCTCGGC	CGCTCGTTAC	1140
BCG2	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GACTCTCGGC	CGCTCGTTAC	1140
Bov3	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GACTCTCGGC	CGCTCGTTAC	1140
Afr1	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GACTCTCGGC	CGCTCGTTAC	1140
Mic1	1081	CTGGGGGTGC	CGTTTACCGA	GCCCGCCAGC	GTGCTGGCCT	GACTCTCGGC	CGCTCGTTAC	1140

Abb. 3.19 (4/5) : Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex

Siehe Legende Seite 101.

40kD	1141	GCCGAGCACA	CGTCGGGAGT	AAGGAAAGCG	ATGATGTCGG	CCGCG	1185
Tub1	1141	GCCGAGCACA	CNTCGGGAGT	AAGGAAAGCG	ATGATGTCGN	C	1185
H37Rv	1141	GCCGAGCACA	CGTCGGGAGT	AAGGAAAGCG	ATGATGTCGG	CCG	1185
H37Ra	1141	GCCGAGCACA	CGTCGGGAGT	AAGGAAAGCG	ATGA		1185
BCG4	1141	GCCGAGCACA	CGTCGGGAGT	AAGGAAAGCG	ATGATGTCGG	CC	1185
BCG2	1141	GCCGAGCACA	CGTCGGGAGT	AAGGAAAGCG	ATGATG		1185
Bov3	1141	GCCGAGCACA	CGTCGGGAGT	AAGGAAAGCG	ATGATGTCGG	CC	1185
Afr1	1141	GCCGAGCACA	CGTCG				1185
Mic1	1141	GCCGAGCACA	CGTCGGGAGT	AAGGAAAGCG	ATGATGTCGG	CC	1185

Abb. 3.19 (5/5) : Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex

Die mit "40kD" bezeichnete Zeile gibt die Sequenz von Andersen *et al.* (1992) wieder. Sequenzunterschiede sind jeweils mit einem "*" über der Sequenz gekennzeichnet. Das Start- und das Stopcodon sind ebenfalls über der Sequenz markiert. Bei den fett gedruckten Basen am Ende der Sequenz handelt es sich um Sequenzierungsungenauigkeiten.

Die erste Stelle an der sich die Sequenzen unterscheiden ist Base -32, also *upstream* des Translations-Startsignals. Interessanterweise unterscheiden sich an dieser Stelle die in dieser Arbeit bestimmten Sequenzen von *M.tuberculosis* H37R_v und H37R_a von der Sequenz von Andersen und Mitarbeitern (Andersen *et al.*, 1992). Alle anderen Sequenzen die in dieser Arbeit untersucht wurden, einschließlich die des dritten getesteten Stammes von *M.tuberculosis*, stimmen mit der Sequenz von Andersen überein.

Dies ist insofern verwunderlich, als daß die ursprünglich publizierte Sequenz auf dem Klon einer λ gt11-Bank beruht, die aus dem Stamm *M.tuberculosis* H37R_v hergestellt worden war. Es wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob eventuell durch die PCR ein Fehler eingeführt worden war. Dies bestätigte sich jedoch nicht. Es könnte jedoch auch möglich sein, daß der in dieser Arbeit benutzte Stamm von *M.tuberculosis* H37R_v einen anderen Ursprung hat als der von Andersen. Ähnliche kleine Varianzen sind auch bei verschiedenen Stämmen unterschiedlichen Ursprungs von *M.bovis* BCG bekannt.

An der zweiten Stelle unterscheiden sich alle Stämme des *M.tuberculosis* Complex von der publizierten Sequenz der AlaDH von *M.tuberculosis* H37R_v. Es handelt sich um

die Region der Basen 38 bis 49. Innerhalb dieser zwölf Basen wird die Sequenz .AATTCC- wiederholt, die Basen 44 bis 49 stellen also ein *direct repeat* der Basen 38 bis 43 dar. In allen acht sequenzierten Stämmen ist dieses Muster jedoch jeweils nur einmal zu finden. Es ist also davon auszugehen, daß sich bei der von Andersen *et al.* (1992) bestimmten Sequenz ein Sequenzierungs- oder Lesefehler eingeschlichen hat. Die Gensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz ändert sich hierdurch folgendermaßen :

Andersen *et al.*, 1992 :

Gensequenz	A	A	C	G	A	A	T	T	C	C	A	A	T	T	C	C	G	G	G	T	G
Proteinsequenz	Asn		Glu		Phe		Gln		Phe		Arg		Val								

Diese Arbeit :

Gensequenz	A	A	C	G	A	A	T	T	C	-	-	-	-	-	-	-	C	G	G	G	T	G
Proteinsequenz	Asn		Glu		Phe		-		-								Arg		Val			

Es handelt sich also effektiv um den 'Verlust' der beiden Aminosäuren Glutamin und Phenylalanin. Nach dieser Deletion setzt sich die Sequenz wie von Andersen *et al.* (1992) publiziert fort.

Dieser Sachverhalt wurde durch die N-terminale Sequenzierung des Proteins bestätigt. Weder im nativen Protein von *M.tuberculosis* H37R_v, noch im rekombinanten Protein aus *E.coli*, waren die beiden Aminosäuren zu finden.

Bei der dritten unterschiedlichen Stelle handelt es sich um Base 272. An dieser Stelle befindet sich, mit der Ausnahme dreier Stämmen, ein Adeninrest. Bei diesen drei Stämmen, *M.bovis* und zwei Stämme von *M.bovis* BCG, ist diese Base deletiert. Diese Deletion führt zu einer Leserasterverschiebung, die den gesamten folgenden Teil des resultierenden Proteins betrifft. Durch diese Leserasterverschiebung tritt an den Basen

404 bis 406 ein *opal*-Stopsignal auf. Damit ist das Produkt dieses Gens nur etwa ein Drittel so groß wie die funktionelle AlaDH der anderen Stämme.

Das entscheidende bei dieser dritten Abweichung in der Gensequenz ist die Tatsache, daß sie genau in den drei Stämmen auftritt, die keine AlaDH-Aktivität zeigen. *M.bovis* und *M.bovis* BCG sind die einzigen Stämme des *M.tuberculosis* Complex, die keine Aktivität zeigen. Alle anderen Stämme wurden als mäßig oder stark positiv klassifiziert. Die beobachtete Deletion ist also der Grund für das Fehlen einer funktionellen AlaDH. Da jedoch mit dem mAb HBT-10 auch nicht das verkürzte Protein nachgewiesen werden kann (das Epitop von HBT-10 liegt im Bereich vor der Leserasterverschiebung), ist davon auszugehen, daß das verkürzte Protein erst gar nicht, bzw. nur in sehr kleinen, mit dem mAb HBT-10 nicht detektierbaren, Mengen, produziert wird.

3.5.2.3 Das AlaDH-Gen von *M.marinum*

Außer den Mitgliedern des *M.tuberculosis* Complex, war es in erster Linie der Stamm *M.marinum*, bei dem bei der PCR mit dem Primerpaar *Annabel* ein Fragment gewonnen werden konnte (Abb. 3.17), das sich bei der späteren Sequenzierung als AlaDH erwies. Wie sich zeigen sollte war dies insofern ein Glücksfall, als daß die meisten anderen PCR's mit den Primerpaaren aus Tab. 3.15 keine, oder zumindest nicht die erwarteten, Fragmente mit diesem Stamm lieferten. Lediglich die PCR mit dem Primerpaar *Giselle* verlief ebenfalls positiv. Wie sich später herausstellte war der Grund hierfür die mangelnde Homologie zwischen den Genen innerhalb der verschiedenen Spezies.

- 34 -

Mar3				50	60	70
				AATTCGGTTAGCGATCACCCGGCCGGCG		
H37Rv	TTCCGACCGAGACCAAAACAACGAATTCCAATTCCGGGTGGCCATCACCCGGCCGGCG					
Mar3	80	90	100	110	120	130
	TCGCCGCTTGACCAAGCGCGGCCACGAGGTGCTGATCCAGGCCGGTGCCGGAGAAGGCT					
H37Rv	TCGCGGAATAACCCGTCGTGGCCATGAGGTGCTCATCCAGGCAGGTGCCGGAGAGGGCT					
Mar3	140	150	160	170	180	190
	CCGCCATCTCCGACGCCGACTTCAAGGCCCGCGGTGCCAGCTGATCAGCACCGCCGACC					
H37Rv	CGGCTATCACCGACGCGGATTTCAAGGCCGAGGCGCGCAACTGGTCGGCACCGCCGACC					
Mar3	200	210	220	230	240	250
	AGGTGTGGGCGGATGCGGACCTGCTGCTCAAGGTCAAGGAACCGATCGAGTCCGAGTACG					
H37Rv	AGGTGTGGGCCGACGCTGATTTATTGCTCAAGGTCAAAGAACCGATAGCGGCGGAATACG					
Mar3	260	270	280	290	300	310
	GCCGGCTGCGCCGGGGCCAGACCTGTTTACCTACCTGCACCTGGCCGCTCGCGCCCT					
H37Rv	GCCGCTGCGACACGGGCAGATCTTGTTACGTTCTTGCAATTGGCCGCGTCACGTGCTT					
Mar3	320	330	340	350	360	370
	GCACCGATGCCCTGCTGAAGTCCGGCACACGTCATCGCTACGAGACCGTGACAGACC					
H37Rv	GCACCGATGCGTTGTTGGATTCCGGCACACGTCATTGCCTACGAGACCGTCCAGACCG					
Mar3	380	390	400	410	420	430
	CCGACGGCGCATTGCCGCTGCTGGCCCCCATGAGCGAGGTGCGCCGGGCGCTGTCCGCCC					
H37Rv	CCGACGGCGCACTACCCCTGCTTGCCCCGATGAGCGAAGTGCCTGGTTCGCTCGCCGCC					
Mar3	440	450	460	470	480	490
	AAGCTGGGGCCTACCACCTGATGCGCACCCACGGCGGTGCGGGCGTGCTGATGGGCGGCG					
H37Rv	AGGTTGGCGCTTACCACCTGATGCGAACCCAGGGGGCCGCGGTGTGCTGATGGGCGGGG					
Mar3	500	510	520	530	540	550
	TCCCCGGCGTCAAGCCTGCCGACGTCGTGGTGATCGGCGCGGGCACGGCCGGATACAACG					
H37Rv	TGCCCGGCGTCAACCGGCCGACGTCGTGGTGATCGGCGCGGGCACCGCCGGCTACAACG					

Abb. 3.20 (1/2): Alignment der AlaDH Gene von *M.marinum* und *M.tuberculosis* H37Rv

Das Screening der Datenbank und das Alignment wurden mit der FASTA-Software (<http://www.embl-ebl.ac.uk/>) durchgeführt (Sensitivität ktup=6). Ein "|" kennzeichnet ein identisches Basenpaar.

- 35 -

	560	570	580	590	600	610
Mar3	CCGCCCGCGTCGCCAACGGCATGGGCGCGATGGTCACCGTGCTGGATGTCAACATCAACA					
H37Rv	CAGCCCGCATCGCCAACGGCATGGGCGCGACCGTTACGGTTCTAGACATCAACATCGACA					
	620	630	640	650	660	670
Mar3	AGCTCCGCCAGATCGACGCGGAGTTCGGCGGTCGCGTCCGGACCCGCTACTCGTCGACCC					
H37Rv	AACTTCGGCAACTCGACGCCGAGTTCGCGCGCGGATCCACACTCGCTACTCATCGGCCT					
	680	690	700	710	720	
Mar3	TCGACCTCGAGGATGCGGCAGTCCACGCCGACATGGTGATCGGGGCCGTCCT					
H37Rv	ACGAGCTCGAGGGTGCCGTCAAACGTGCCGACCTGGTGATTGGGGCCGTCCTGGTGCCAG					

Abb. 3.20 (2/2): Alignment der AlaDH Gene von *M.marinum* und *M.tuberculosis* H37R_v

Das Screening der Datenbank und das Alignment wurden mit der FASTA-Software (<http://www.embl-ebi.ac.uk/>) durchgeführt (Sensitivität ktup=6). Ein "|" kennzeichnet ein identisches Basenpaar.

Insgesamt konnten 682 Basen dieses Gens bestimmt werden (Abb. 3.20), was etwa 60% des kompletten Gens ausmacht. Diese 682 Basen kodieren den N-terminalen Bereich des Proteins. Es fehlen lediglich die ersten 35 Basen nach dem Startcodon.

Der sequenzierte Abschnitt der AlaDH von *M.marinum* zeigt 80,4% Identität mit dem entsprechenden Abschnitt von *M.tuberculosis* H37R_v. Die Sequenzunterschiede sind relativ gleichmäßig über den gesamten Abschnitt verteilt.

Das abgeleitete Peptid der *M.marinum* Gensequenz (Abb. 3.21) zeigt 85,3% Identität und 92,0% Ähnlichkeit mit dem Protein von *M.tuberculosis* H37R_v. Homologien zu anderen Proteinen der Swiss Prot-Datenbank sind in Tab. 3.15 wiedergegeben (Stand : 9/1996, Release 33). Als Vergleich sei erwähnt, daß die AlaDH von *M.tuberculosis* 53% Identität zu den Enzymen von *B.sphaericus* und *B.stearothermophilus* aufweist (Andersen *et al.*, 1992). Bei der AlaDH von *M.marinum* ist eine Identität von 51% mit dem Enzym von *B.sphaericus* bzw. von 50% mit dem Enzym von *B.stearothermophilus* festzustellen (Tab. 3.15).

- 36 -

```

**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....
Mar3   14  FRLAITPAGVAALTRGHEVLIQAGAGEGSAISDADFKAAGAQLISTADQVWADADLLLK 73
H37Rv  14  FRVAITPAGVAELTRGHEVLIQAGAGEGSAITDADFKAAGAQLVGTADQVWADADLLLK 73

*****.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....
Mar3   74  VKEPIESEYGRLRPGQTLFTYLHLAASRPCTDALLKSGTTSIAYETVQTADGALPLLAPM 123
H37Rv  74  VKEPIAAEYGRLRHGQILFTFLHLAASRACTDALLDSGTTSIAYETVQTADGALPLLAPM 123

*****.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....
Mar3  134  SEVAGRLSAQAGAYHLMRTHGGRGVLMGGVPGVKPADVVVIGAGTAGYNAAEVANGMGAM 183
H37Rv 134  SEVAGRLAAQVGAYHLMRTQGGRGVLMGGVPGVEPADVVVIGAGTAGYNAAIRIANGMGAT 183

*****.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....
Mar3  184  VTVLDVNINKLRQIDAEFGGRVETRYSSITLDLEDAAVHADMVIGAV 229
H37Rv 184  VTVLDINIDKLRLQDAEFCGRINTRYSSAYELEGAVKRADLVIGAV 229

```

Abb. 3.21 : Alignment der AlaDH's von *M.marinum* und *M.tuberculosis* H37R_v

Ein "*" zeigt eine identische, ein "." eine funktionell verwandte Aminosäuren an. Das Screening der Datenbank und das Alignment wurden mit der FASTA-Software (<http://www.embl-ebi.ac.uk/>) durchgeführt (Sensitivität ktup=2).

Tab. 3.15 : Proteine mit Homologie zur AlaDH von *M.marinum*

Die Swiss Prot - Datenbank wurde mit der FASTA-Software (<http://www.embl-ebi.ac.uk/>) durchsucht (Stand : 9/1996, Release 33).

Protein	Organismus	Identität	Ähnlichkeit
AlaDH	<i>M.tuberculosis</i>	85,3 %	92,0 %
AlaDH	<i>B.sphaericus</i>	50,9 %	69,0 %
AlaDH	<i>B.stearothermophilus</i>	50,0 %	67,7 %
AlaDH	<i>B.subtilis</i>	48,7 %	68,6 %
PNT	Rind, mitochondrial	33,7 %	51,4 %
PNT	<i>E.coli</i>	30,7 %	50,0%
PNT	<i>Haemophilus influenzae</i>	28,8 %	49,2 %

Als essentiell für die Bindung des Cofaktors der AlaDH von *M.tuberculosis* H37R_v werden die Aminosäurereste Gly165, Gly167, Gly170 und Asp198 betrachtet. Diese vier Aminosäurereste stellen ein Charakteristikum der $\beta\alpha\beta$ -Sekundärstruktur von

- 37 -

NAD(H)-Bindungsstellen dar (Wierenga *et al.*, 1986; Bork & Grunwald, 1990). Im Enzym von *M.marinum*, genauso wie bei sämtlichen anderen AlaDH's in Tab. 3.14, sind diese vier Reste konserviert.

Der entsprechende Abschnitt des Epitops des mAb HBT-10 bei der AlaDH von *M.marinum* hat die Sequenz A I S D A D F K A A G, und unterscheidet sich damit lediglich an der dritten Stelle von der Sequenz von *M.tuberculosis* H37R_v. Aufgrund des in dieser Arbeit bestimmten Konsensus epitops des Antikörpers (Tab. 3.9), müsste dieser auch mit der AlaDH von *M.marinum* reagieren. Tatsächlich ist dieser Stamm auch der einzige, mit dem eine Kreuzreaktion beobachtet werden konnte (Andersen *et al.*, 1992). Die ermittelte Sequenz stimmt also auch mit dieser Beobachtung überein.

AlaDH-Aktivität in Mykobakterien. Die gemessenen AlaDH-Aktivitäten lassen einige interessante Beobachtungen bezüglich der Lebensweise der Organismen mit positiver Aktivität zu.

Die Stämme mit starker Aktivität sind allesamt pathogen. Interessant ist hierbei, daß zwei der vier in diese Gruppe fallenden Stämme pathogen für Fische sind (Austin & Austin, 1987). Alle beide, *M.marinum* und *M.chelonae*, können jedoch auch Menschen

- 39 -

infizieren (Wallace *et al.*, 1983; Johnston & Izumi, 1987). Im Gegensatz zur Tuberkulose lösen sie jedoch meist krankhafte Infektionen der oberen Hautschichten aus, die meist relativ unproblematisch zu behandeln sind.

M.chelonae ist ein vergleichsweise schnell wachsendes, nicht-chromogenes Bakterium. Infektionen beim Menschen treten oft als sekundäre Wundinfektionen nach Operationen auf (Cooper *et al.*, 1989). *M.marinum* ist ein langsam wachsender Organismus, der bei Wachstum an Licht ein gelbes Pigment bildet. In mehr als 50 wechselwarmen Spezies (Reptilien, Amphibien, Fische) wurden Infektionen mit *M.marinum* nachgewiesen (Clark & Shepard, 1963). Beim Menschen manifestiert sich das Bakterium meist im Ellbogen- oder Kniebereich.

Die beiden anderen Stämme mit stark-positiver AlaDH-Aktivität sind Vertreter des *M.tuberculosis* Complex. Es sind dies der Tuberkulose-Referenzstamm *M.tuberculosis* H37R_v, sowie der Stamm *M.microti*, der als phylogenetisches Bindeglied zwischen *M.tuberculosis* und *M.bovis* betrachtet wird.

Bis auf *M.smegmatis* sind auch alle als mäßig-positiv klassifizierten Stämme pathogen. Der Großteil dieser Stämme umfasst klinische Isolate von *M.tuberculosis*. Pathogene Varianten von Tuberkulose-Stämmen scheinen also in der Regel AlaDH-Aktivität zu besitzen. Es wurden jedoch auch zwei Isolate gefunden, die keine AlaDH-Aktivität aufweisen. Der einzige nicht-pathogene Organismus mit AlaDH-Aktivität ist der schnell wachsende Stamm *M.smegmatis*. *M.smegmatis* weist sich jedoch durch eine ungewöhnlich starke NAD⁺-reduzierende Hintergrundaktivität aus, und ist deshalb sehr leicht von allen anderen Stämmen mit AlaDH-Aktivität zu unterscheiden. Desweiteren wurde im Stamm *M.smegmatis* 1-2c, ein mykobakterieller Expressionsstamm, keine AlaDH-Aktivität gefunden.

Innerhalb der 44 getesteten Mykobakterien-Stämme, und dies ist bei weitem der Großteil aller bekannten Stämme, ist deshalb die Folgerung erlaubt :

III➤ Ein langsam wachsendes Mykobakterium mit positiver AlaDH-Aktivität ist virulent.

Der Umkehrschluß dieser Feststellung ist jedoch falsch. Unter den Stämmen ohne AlaDH-Aktivität sind etliche virulente. Trotzdem kommt man nicht umhin eine, wenn auch nicht feste, Tendenz festzustellen, nach der die AlaDH-Aktivität mit steigender Pathogenität eines Stammes zunimmt. Insbesondere durch die Aktivitäten der verschiedenen Stämme von *M.tuberculosis* wird diese These unterstrichen. Die mit Abstand höchste Aktivität hat der Stamm H37R_v, der als Referenzstamm für alle Tuberkulose-Laboratorien dient, und eine bekannt hohe Infektiösität besitzt. Ganz am Ende rangiert das avirulente Derivat von H37R_v, der Stamm H37R_a. Zwischen diesen beiden Polen rangieren die klinischen Tuberkulose-Isolate, die mal etwas mehr und mal etwas weniger Aktivität zeigen.

Das *AlaDH*-Gen in Mykobakterien. Das Gen für die Alanin Dehydrogenase konnte in allen untersuchten Stämmen des *M.tuberculosis* Complex und im Stamm *M.marinum* identifiziert werden.

Der entscheidene Punkt beim Vergleich der Sequenzen innerhalb des *M.tuberculosis* Complex ist die Deletion der Base 272, die bei den untersuchten Stämmen von *M.bovis* und *M.bovis* BCG zu einer Leserasterverschiebung und letztendlich zu einem verkürzten, nicht-funktionellen Protein führt. Bei diesen Stämmen ließ sich auch in Zellextrakten keine AlaDH-Aktivität nachweisen. Diese Daten stimmen auch mit den Ergebnissen von Andersen *et al.* (1992) überein, die in Southern Blots zwar Signale mit diesen Stämmen erhielten, aber in Western Blots kein Protein nachweisen konnten.

Durch die Amplifikation und Sequenzierung des Gens konnte in dieser Arbeit die Ursache hierfür gefunden werden. Es muß jedoch auch in Betracht gezogen werden,

daß noch weitere Änderungen in den regulatorischen Genabschnitten für das Fehlen des verkürzten Proteins verantwortlich sein können. Dies könnte eine Maßnahme der Zelle sein, keine Energie in ein nicht funktionsfähiges Protein zu investieren. Allgemein ist über regulatorische Gensequenzen bei Mykobakterien noch nicht viel bekannt (Dale & Patki, 1990; Gupta *et al.* 1993). Es scheint jedoch, daß, nach dem Prinzip von *Enhancern*, auch weiter weg gelegene Abschnitte die Genexpression nicht unerheblich beeinflussen können. Die für eine Einstellung der Produktion des Proteins nötigen Mutationen müssen also nicht zwangsläufig auf dem in dieser Arbeit sequenzierten Bereich liegen.

Das andere identifizierte *AlaDH*-Gen, jenes von *M.marinum*, ist auf DNA-Ebene deutlich unterschiedlich von den Genen des *M.tuberculosis* Complex. Immerhin vier von fünf Basen (80,4%) sind beim Vergleich dieser Sequenzen jedoch durchschnittlich noch identisch. Dieser Wert ist auf Proteinebene noch höher (85,3% Identität, 92,0% Ähnlichkeit). Da *AlaDH*-Aktivität jedoch auch in einer Reihe weiterer Spezies gefunden wurde, ist davon auszugehen, daß sich die entsprechenden Gene, mangels Homologie zu den benutzten Primern, bei den benutzten Bedingungen nicht amplifizieren ließen. Eine eingehendere Studie betreffs dieses Punktes müsste auch diese Gene auffinden können. Ein Vergleich all dieser Sequenzen könnte weitere Rückschlüsse auf die Rolle des Enzyms zulassen.

Desweiteren ist denkbar, daß sich anhand eines solchen Sequenzvergleiches ein PCR-Verfahren entwickeln lassen müsste, mit dem man Mykobakterien, die ein *AlaDH*-Gen besitzen, voneinander unterscheiden kann. Und wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind es eben die für den Menschen bedeutenden Stämme, die ein *AlaDH*-Gen besitzen. Besonders die Möglichkeit, mit einem solchen PCR-Assay den Erreger *M.tuberculosis* vom Impfstamm *M.bovis* BCG unterscheiden zu können, lassen ein solches Vorhaben interessant erscheinen.

Ausblick. Das in dieser Arbeit behandelte 40 kD-Antigen stellt in mehrererlei Hinsicht ein lohnenswertes Objekt für weitergehende Untersuchungen dar. Ein Punkt, der in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt wurde, ist die mögliche Anwendung dieses Enzyms in der medizinischen Diagnostik. So wurden bereits für die Enzyme Dipeptidase (Ito *et al.*, 1984), γ -Glutamyltransferase (Kondo *et al.*, 1992) und γ -Glutamyl Cyclotransferase (Takahashi *et al.*, 1987) Assays beschrieben, die auf einer AlaDH basieren. Alle drei genannten Enzyme sind bei verschiedenen Krankheiten in veränderten Urin-, Serum- bzw. Blutkonzentrationen vorzufinden.

Das Hauptaugenmerk liegt jedoch auf dem Einsatz des 40 kD-Antigens bei der Tuberkulose. Ansatzpunkte sind hierbei an mehreren Stellen denkbar.

Allein bei der Diagnostik sind mehrere Möglichkeiten vorstellbar, wie das 40 kD-Antigen, bzw. das ihm zugrundeliegende Gen, genutzt werden könnte. Da das rekombinante Protein nun leicht aus dem überproduzierenden *E.coli* Stamm gewonnen werden kann, erscheint es lohnenswert, die Nützlichkeit dieses Proteins in der Serologie zu überprüfen. Zudem könnten sich diagnostische Verfahren entwickeln lassen, die auf dem direkten Nachweis von AlaDH-Aktivität oder, wie bereits erwähnt, auf der Amplifikation spezifischer Teile des Gens beruhen. Die Deletion der Base 272 in den Stämmen *M.bovis* und *M.bovis* BCG kann hierbei als Ansatzpunkt der Diskriminierung dieser beiden Stämme von *M.tuberculosis* dienen.

Ein PCR-Assay müsste sich auch für den Stamm *M.marinum* etablieren lassen, der sich ja auf Genebene nicht unerheblich vom *M.tuberculosis* Complex unterscheidet. Bislang wird zu diesem Zweck ein PCR-Assay, beruhend auf der Amplifikation eines Teils der für die 16S rRNA kodierenden Gensequenz, eingesetzt (Knibb *et al.*, 1993). Dies ist, in Anbetracht der in den letzten Jahren steigenden Zahl von Infektionen mit *M.marinum* in Fischfarmen (Knibb *et al.*, 1993), von großer Bedeutung. Auch Infektionen beim Menschen werden in den letzten Jahren gehäuft vermeldet (Harris *et al.*, 1991; Kullavanijaya *et al.*, 1993; Slosarek *et al.*, 1994).

Die Beobachtung, daß die Virulenz eines Stammes von *M.tuberculosis* sehr gut mit seiner AlaDH-Aktivität korreliert, wirft erneut die Frage auf, ob das Enzym einen

-43-

Virulenzfaktor darstellt. Zur Beantwortung dieser Frage sind Ansätze denkbar, wie der *knock-out* des Gens in *M.tuberculosis* oder die Überexpression des Gens in einem Stamm mit niedriger Virulenz. In beiden Fällen kann die Virulenz im Tiermodell überprüft werden.

Die Offenbarung der vorliegenden Anmeldung umfaßt auch die Offenbarung der anliegenden EP 97 101 339.6, insbesondere die darin angeführte Literatur. Die Offenbarung umfaßt auch sämtliche denkbaren Kombinationen offenbarter Einzelmerkmale.

5. Zusammenfassung

Die Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, der jährlich über 3 Millionen Menschen zum Opfer fallen. Es gibt zwar sowohl einen Impfstoff, als auch verschiedene Diagnose- und Therapieverfahren, doch die Effektivität all dieser Maßnahmen bedarf, angesichts der wieder steigenden Zahl der Erkrankungsfälle, dringend einer Verbesserung.

Ein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Charakterisierung von Antigenen, die frühzeitig während einer Infektion sekretiert werden, da diese den ersten Kontakt des Immunsystems mit dem Erregers herstellen. Das in dieser Arbeit behandelte 40 kD-Antigen liegt *in vivo* als Hexamer vor, und ist trotz des hohen Molekulargewichts und des Fehlens einer Signalsequenz bereits nach wenigen Tagen des Wachstums extrazellulär zu finden. Es stellt funktionell eine L-Alanin Dehydrogenase dar und reagiert mit dem gegen dieses Protein gerichteten monoklonalen Antikörper HBT-10. HBT-10 war der erste bekannte Antikörper, der spezifisch für ein Protein von *M.tuberculosis* ist und nicht mit dem Impfstamm *M.bovis* BCG kreuzreagiert.

1. Das für das 40 kD-Antigen kodierende Gen war bereits in einen Plasmidvektor für *E.coli* kloniert und die Expression des resultierenden Plasmids optimiert worden. In dieser Arbeit wurde eine komplett neue Methode etabliert, die es ermöglicht, das hexamere Protein in einem Zwei-Schritt-Verfahren in löslicher und aktiver Form aufzureinigen.

2. Alle wesentlichen biochemischen Parameter des rekombinanten Enzyms wurden bestimmt. Die ermittelten Eigenschaften stehen in Einklang mit denen anderer beschriebener L-Alanin Dehydrogenasen. Das Enzym von *M.tuberculosis* ist die Alanin

Dehydrogenase mit dem niedrigsten bekannten pH-Optimum für die reduktive Aminierung.

3. Die ermittelten biochemischen Daten sprechen stark für eine Rolle des Enzyms bei einem frühen Schritt der Peptidoglycansynthese. Es stellt hierbei L-Alanin, das auch die Vorstufe von D-Alanin ist, für die Synthese der Penta- bzw. Tetrapeptidketten der *N*-Glycolylmuraminsäure zur Verfügung. Dies ist die erste Beschreibung dieser Aufgabe für eine L-Alanin Dehydrogenase.

4. Eine postulierte Kreuzreaktion des monoklonalen Antikörpers HBT-10 mit der PNT wurde widerlegt. Der These, das 40 kD-Antigen interveniere in das kritische Gleichgewicht zwischen NADH und NADPH, wurde dadurch eine Grundlage entzogen. Auch auf die Fähigkeit des intrazellulären Überlebens in Makrophagen hat das 40kD-Antigen, zumindest in Abwesenheit anderer mykobakterieller Proteine, keinen Einfluß.

5. Über 40 mykobakterielle Stämme wurden auf das Vorhandensein von AlaDH-Aktivität hin untersucht. Alle Stämme die AlaDH-Aktivität aufweisen, sind virulent. *M.bovis* BCG zeigt keinerlei Aktivität. Zudem scheint das Ausmaß der Aktivität mit dem Grad der Virulenz eines *M.tuberculosis*-Stammes zu korrelieren.

6. Das Gen für die Alanin Dehydrogenase wurde aus acht Stämmen des *M.tuberculosis* Complex komplett sequenziert. In den Stämmen *M.bovis* und *M.bovis* BCG wurde eine Deletion gefunden, die zu einer Leserasterverschiebung führt und für das Fehlen von meßbarer Aktivität in diesen Stämmen verantwortlich ist.

7. Das *AlaDH*-Gen aus *M.marinum* wurde identifiziert und ein Großteil der Sequenz bestimmt. Das Gen besitzt etwa 80% Identität mit dem Gen von *M.tuberculosis*.

7. Anhänge

Abkürzungsverzeichnis

A	präexponentieller Faktor oder Stoßfaktor
A _{xxx}	Absorption bei einer Wellenlänge von xxx nm
AlaDH	L-Alanin Dehydrogenase (E.C. 1.4.1.1.)
AMC	Academic Medical Centre, Amsterdam, Niederlande
Ap	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
app.	apparent
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCG	Bacille Calmette Guérin
BCIG	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
bp	Basenpaar(e)
cfu	colony forming units
Cm	Chloramphenicol
Conc	Konzentration
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	Dithiobisnitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
E _a	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eth	Ethionamid

- 47 -

F	Farad
FBS	Fötales Rinderserum
FCS	Fötales Kalbsserum
Fmoc	9-Flourenylmethoxycarbonyl
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
frag.	Fragment
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
GBF	Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, Deutschland
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gm	Gentamicin
GOGAT	Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS	Glutamin-Synthetase
GST	Glutathion-S-Transferase
<i>h</i>	Stunde(n)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HRP	Horseradish Peroxidase
Hsp	Hitzeschockproteine
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INH	Isonicotinsäurehydrazid, Isoniazid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
<i>k</i>	Umsatzrate eines Enzyms
kb	Kilobasen
KBL	Kilobasenleiter
kD, kDa	Kilodalton
KIT	Royal Tropical Institute, Amsterdam, Niederlande
K_M	Michaelis-Konstante
Km	Kanamycin
$M\Phi$	Makrophage(n)
mAb	monoklonaler Antikörper
MAIS	<i>M. avium</i> - <i>M. intracellulare</i> - <i>M. scrofulaceum</i> Complex

MBP	maltose binding protein
MCAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie
mesoDAP	meso Diaminopimelinsäure
min	Minute(n)
m.o.i.	multiplicity of infection
MRC	Medical Research Council, Tuberculosis and Related Infections Unit, London, England
MTT	Thiazolylbluetetrazoliumbromid
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MurNGI	N-Glycolylmuraminsäure
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitrobluetetrazoliumchlorid
Nr.	Nummer
NTP	beliebiges Nucleosid in Form eines Triphosphats
oD	oxidative Desaminierung
ORF	open reading frame, offenes Leseraster
OtBu	tert-Butylester
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pac	protein antigen c, alte Bezeichnung für das 40 kD-Antigen
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Pfp	Pentafluorphenyl
PMA	Phorbolmyristatacetat
Pmc	Pentamethylchroman
PMS	Phenazinmethosulfat
PNT	Pyridinnukleotid-Transhydrogenase
PPD	Purified protein derivative
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rydberg-Konstante oder Resistenz (wenn Buchstabe hochgestellt)
rA	reduktive Aminierung
rec	rekombinant
Rha	Rhamnose

Rif	Rifampicin
RIV	National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Niederlande
RNA	Ribonukleinsäure
RNI	reaktive nitrogen intermediates, reaktive Stickstoff-Intermediate
ROI	reaktive oxygen intermediates, reaktive Sauerstoff-Intermediate
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Str	Streptomycin
Tb	Tuberkulose
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tertamethylethylen-diamin
TIR	Translations-Initiationsregion
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
ts	temperatur-sensitiv
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit(s)
ÜN	über Nacht
unveröff.	unveröffentlicht
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VMDC	Veterinary Microbiological Diagnostic Centre, Utrecht, Niederlande
Vol.	Volumen
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
WKZ	Academisch Ziekenhuis, Utrecht, Niederlande
z.A.	zur Analyse, von höchstem Reinheitsgrad

- 50 -

Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide

Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Base	Nukleosid / Nukleotid	Abkürzung
Adenin	Adenosin	A
Cytosin	Cytidin	C
Guanin	Guanosin	G
Uracil	Uridin	U
Thymin	Thymidin	T

DNA-Sequenz von *Mycobacterium marinum* und Verwendung

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. DNA-Sequenz (I) von *Mycobacterium marinum* der folgenden Formel, dazu komplementäre DNA-Sequenz, doppelsträngige DNA-Sequenz aus der DNA-Sequenz (I) und ihrem komplementären Strang, deren Teilsequenzen und mit ihnen vorzugsweise bei einer Temperatur von mindestens 20 °C und insbesondere bei einer Konzentration von 1 M NaCl und einer Temperatur von mindestens 25 °C hybridisierbare DNA-Sequenzen:

- 52 -

Mar3 50 60 70
 AATTCGGTTAGCGATACCCCGGCCGGCG
 |||||
 H37Rv TFCGGAGGGAGAGGAAAAAGAAAGGAATTCATTCGGGGTGGGCAATCAACCCCGGCCGGCG

Mar3 80 90 100 110 120 130
 TCGCCGCCTTGACCAAGCGCGGCCACGAGGTGCTGATCCAGGCCGGTGCCGGAGAAGGCT
 |||||
 H37Rv TCGCGGAATAACCCGTGCTGGGCAATCAAGGTGCTCATTCAGGCAAGGTGCGCGAGAGGGCT

Mar3 140 150 160 170 180 190
 CCGCCATCTCCGACGCGCGACTTCAAGGCCGCCGGTGCCAGCTGATCAGCACCCGCCGACC
 |||||
 H37Rv CCGGTATCAACGAGCGCGGATTCAGGCGCGCGAGGCGCGCACTGGTGGGCAACCGCGGAG

Mar3 200 210 220 230 240 250
 AGGTGTGGGCGGATGCGGACCTGCTGCTCAAGGTCAAGGAACCGATCGAGTCCGAGTACG
 |||||
 H37Rv AGGTGTGGGCGGAGGCTGATTCATTCGCTCAAGGTCAAGGAACCGATCGAGTCCGAGTACG

Mar3 260 270 280 290 300 310
 GCCGGCTGCGCGCGGCCAGACCTGTTACCTACCTGCACCTGGCCGCCTCGCGCCCCCT
 |||||
 H37Rv GCGCGCTGCGCAACCGCGGAGATCTTGTTCAGCTTCTTGCATTTGGCGCGGTGAGGTGCTT

Mar3 320 330 340 350 360 370
 GCACCGATGCCCTGCTGAAGTCCGGCACACGTCCTACGCTACGAGACGGTGCAGACCG
 |||||
 H37Rv GCACCGATGGGCTTGTTCGATTCGGGCAAGCAAGTCAATTGGCTAGGAGACCGTGCAGACCG

Mar3 380 390 400 410 420 430
 CCGACGGCGCATTGCCGCTGCTGGCCCCCATGAGCGAGGTGCGCCGGGCGCCTGTCCGCCC
 |||||
 H37Rv CCGAAGCGCGCACTAACCCCTGCTTGGCGCGGATGAGCGAAGTGGCGCGGTGAGCTCGCGCGCG

Mar3 440 450 460 470 480 490
 AAGCTGGGGCCTACCACTGATGCGCACCCACGGCGGTGCGCGCGTGTGCTGATGGGCGGCG
 |||||
 H37Rv AAGTTGGGCTTAACCACTGATGCGCAACCAAGGGGGCGCGGTGTGCTGATGGGCGGCG

Mar3 500 510 520 530 540 550
 TCCCCGGCGTCAAGCCTGCCGACGTCGTGGTGATCGGCGCGGGCACGGCCGGATACAACG
 |||||
 H37Rv TCGCGCGGTGCAACCGCGGACGTCGTGGTGATCGGCGCGGGCAACCGCGGTGAGTACGAG

Mar3 560 570 580 590 600 610
 CCGCCCGCTCGCCAACGGCATGGGCGCGATGGTCACCGTGCTGGATGTCAACATCAACA
 |||||
 H37Rv CAGCGCGCATCGCGAACGGCATGGGCGCGAAGCGTTACGGTTCTAGACATCAACATCGACA

Mar3 620 630 640 650 660 670
 AGCTCCGCCAGATCGACGCGGAGTTCGGCGGTGCGGTCCGGACCGCTACTCGTCGACCC
 |||||
 H37Rv AAGTTGGGCTTAACCACTGATGCGCAACCAAGGGGGCGCGGTGTGCTGATGGGCGGCG

Mar3 680 690 700 710 720
 TCGACCTCGAGGATGCGGCACTCCACGCCGACATGGTGATCGGGGCGGCTCTCT
 |||||
 H37Rv ACGAGCTCGAGGCTGCGGCACTCCACGCCGACATGGTGATCGGGGCGGCTCTCT

(I)

-53-

2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, dadurch *gekennzeichnet*, daß man mit ihrer Hilfe Alanindehydrogenase herstellen oder gewinnen und

(i) zur Diagnose von Tuberkulose in Menschen und Tieren und/oder

(ii) zur Diagnose von anderen mycobakteriellen Infektionen in Menschen und Tieren verwenden kann, die insbesondere durch *Mycobacterium marinum* verursacht werden.

3. RNA als Transkript einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, insbesondere zur Verwendung

(i) bei Diagnose von Tuberkulose in Menschen und Tieren und/oder

(ii) bei der Diagnose von anderen mycobakteriellen Infektionen in Menschen und Tieren, die insbesondere durch *Mycobacterium marinum* verursacht werden.

4. Protein, das durch eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 kodiert wird und insbesondere Alanindehydrogenase entspricht und

(i) zur Diagnose von Tuberkulose in Menschen und Tieren und/oder

(ii) zur Diagnose von anderen mycobakteriellen Infektionen in Menschen und Tieren verwendet werden kann, die insbesondere durch *Mycobacterium marinum* verursacht werden.

5. Protein der folgenden Sequenz (II)

.** **.*.*****.*****.*****
 Mar3 14 FRLAITPAGVAALTKRGHEVLIQAGAGEGSAISDADFKAAGAQLISTADQVWADADLLK 73
~~H37Rv 14 FRVAITPAGVAELTRRGHEVLIQAGAGEGSAITDADFKAAGQLVGTADQVWADADLLK 73~~

*****.***** **.*.*****.*****.*****
 Mar3 74 VKEPIESEYGRLLRGQTLFTYLHLAASRPCTDALLKSGTTSIAYETVQTADGALPLLAPM 123
~~H37Rv 74 VKEPIAEEYGRLLRHGQILFTFLHLAASRACTDALLDSGTTSIAYETVQTADGALPLLAPM 123~~

*****.*.*****.*****.*****.*****
 Mar3 134 SEVAGRLSAQAGAYHLMRTHGGRGVLMGGVPGVKPADVVVIGAGTAGYNAARVANGMGAM 183
~~H37Rv 134 SEVAGRLAAQVGAYHLMRTGGGRGVLMGSPGVSPADVVVIGACTAGYNAARIANGMGAT 183~~

*****.*.*****.*****.*****
 Mar3 184 VTVLDVNINKLRQIDAEEGGRVTRYSSITLDLEDAAVHADMVIGAV 229
~~H37Rv 184 VTVLDINIDKLRQLDAEEGGRITRYSSAYELEGAVKPADLVIGAV 229~~

-54 -

sowie Oligopeptid, das von einer DNA-Sequenz kodiert wird, die mit einer DNA-Sequenz, die das Protein der Formel (II) kodiert, vorzugsweise bei einer Temperatur von mindestens 20 °C und insbesondere bei einer Konzentration von 1 M NaCl und einer Temperatur von mindestens 25 °C, hybridisierbar ist, sowie Oligopeptid, das von einer Teilsequenz der hybridisierbaren DNA-Sequenz kodiert wird.

6. Spezifisches und empfindliches Verfahren zur Identifizierung von Mycobakterien in einem Medium, dadurch *gekennzeichnet*, daß man

- (i) Zellen, Stämme oder Spezies von Mycobakterien isoliert,
- (ii) rohe oder gereinigte genomische DNA oder RNA gewinnt,
- (iii) die genomische DNA oder RNA oder ein cDNA-Fragment identifiziert, deren Sequenz mit dem des Alanindehydrogenase-Gens von *Mycobacterium tuberculosis* (Fig. 3.20) identisch oder praktische identisch ist, indem man vorzugsweise mit Hilfe einer Primer-Sequenz auf Basis der Nucleotidsequenz gemäß Anspruch 1 amplifiziert,
- (iv) wonach man die DNA mit einem Restriktionsenzym, vorzugsweise BglII, verdaut und einer Gelelektrophorese unterwirft
- (v) und/oder die DNA-Sequenz der amplifizierten DNA bestimmt.

7. Verwendung von Alanindehydrogenase aus *Mycobacterium marinum* (Wildtyp) für die Diagnose von Tuberkulose durch Messen der Enzymaktivität oder durch eine immunologische Methode.

8. Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Alanindehydrogenase, dadurch *gekennzeichnet*, daß man mit Hilfe einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 in Bakterien, Hefe, Pilzen, höheren Eucaryoten oder Zelllinien die rekombinante Alanindehydrogenase bildet und gewinnt.

9. Verwendung der gemäß Anspruch 8 gewonnenen rekombinanten Alanindehydrogenase zur Diagnose von mycobakteriellen Infektio-

- 55 -

nen, insbesondere Tuberkulose und der Schwimmer-Krankheit (swimmer's disease) in Menschen und Tieren.

10. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 und/oder von nativer oder rekombinanter Alanindehydrogenase von *Mycobacterium marinum* zum direkten Nachweis und zur Diagnose von Tuberkulose und anderen mycobakteriellen Infektionen in Menschen und Tieren in klinischen Proben.

11. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 und/oder von nativer oder rekombinanter Alanindehydrogenase von *Mycobacterium marinum*

- (i) bei der Bekämpfung von Epidemien und/oder
- (ii) nach Vakzinierung (follow-up) von Menschen und Tieren.

12. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 und/oder von nativer oder rekombinanter Alanindehydrogenase von *Mycobacterium marinum* zur Ermittlung, zum Testen, Gewinnen und Herstellen von Substanzen, die Erreger von Tuberkulose oder anderen mycobakteriellen Erkrankungen beim Menschen und Tieren inhibieren.

13. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 und/oder nativer oder rekombinanter Alanindehydrogenase von *Mycobacterium marinum* für Biotransformationsreaktionen, die für L-Alanin spezifisch sind.